

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Kristina Knezović

746/PI

**OPTIMIZACIJA UVJETA
EKSTRAKCIJE HISTAMINA IZ RIBE
ZA DETEKCIJU SERS-OM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sanje Vidaček, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć dr.sc. Tibor Janči.

Hvala izv. prof. dr. sc. Sanji Vidaček na pomoći i savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Tiboru Janči na pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Od srca hvala mojoj obitelji na neizmjernoj podršci, beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Veliko HVALA svima!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIZACIJA UVJETA EKSTRAKCIJE HISTAMINA IZ RIBE ZA DETEKCIJU SERS-OM

Kristina Knezović, 746/PI

Sažetak: Zbog svoje toksičnosti, histamin je jedan od najproučavanijih biogenih amina. Rana detekcija histamina u ribi i proizvodima od ribe nužna je kako bi se na vrijeme spriječilo histaminsko trovanje. Iz tog razloga istražuju se nove metode poput Raman spektroskopije. U ovom radu ispitana je mogućnost primjene različitih postupaka pripreme uzoraka s ciljem bržeg i jednostavnijeg provođenja SERS analize. Za što uspješniju ekstrakciju histamina korištena su različita otapala: perkloratna kiselina (Ekstrakt A), 0,1 M NaOH (Ekstrakt B) i 0,5 M NaOH (Ekstrakt C). Nakon snimanja i obrade SERS spektara vidljive su karakteristične vrpce histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} . Koeficijent korelacije (R^2) za kalibracijski model ekstrakta B temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} iznosi 0,698, a za model ekstrakta B na 1570 cm^{-1} iznosi 0,991, te se isti pokazao kao najbolji model. Također, najveća točnost postignuta je primjenom istog modela dobivenog linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na 1570 cm^{-1} . Iako se postupak pripreme ekstrakta B za detekciju histamina SERS analizom pokazao uspješnim te vrlo blizu standardnom postupku, njegova daljnja primjena nije preporučljiva zbog problema koji se javljaju u procesu homogenizacije uzorka.

Ključne riječi: *histamin, koeficijent korelacije, Raman spektroskopija, riba, SERS*

Rad sadrži: 40 stranica, 16 slika, 2 tablice, 57 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr. sc. Sanja Vidaček*

Pomoćpri izradi: *dr. sc. Tibor Janči*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino*
2. izv. prof. dr. sc. *Sanja Vidaček*
3. doc. dr. sc. *Marina Krpan*
4. izv. prof. dr. sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

Datum obrane: 24. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF EXTRACTION OF HISTAMINE FROM FISH FOR SERS DETECTION

Kristina Knezović, 746/PI

Abstract: Histamine is one of the most investigated biogenic amines because of its toxicity. Early detection of histamine in fish and fish products is necessary to prevent histamine poisoning on time. For this reason new methods like Raman spectroscopy are being investigated. The aim of this study is to investigate the possibility of applying different sampling procedures to improve the SERS analysis. To increase extraction of histamine various solvents were used: perchloric acid (Extract A), 0.1 M NaOH (Extract B) and 0.5 M NaOH (Extract C). After capturing and treating the SERS spectrum, characteristic histamine bands are visible at 1264 and 1570 cm^{-1} . Correlation coefficient (R^2) for calibration model of extract B based on intensity of histamine band at 1264 cm^{-1} is 0,698 and 0,991 for model of extract B at 1570 cm^{-1} . Based on given results, the last one is determined to be the more accurate model. Also, the highest accuracy was achieved by applying the same model obtained by linear regression based on intensity of histamine at 1570 cm^{-1} . The procedure of preparing extract B for histamine detection has proven to be successful and very close to the standard procedure but its further use is not recommended because of problems occurring in the homogenization process.

Keywords: *correlation coefficient, fish, histamine, Raman spectroscopy, SERS*

Thesis contains: 40 pages, 16 figures, 2 tables, 57 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Sanja Vidaček, Associate professor*

Technical support and assistance: *PhD. Tibor Janči*

Reviewers:

1. PhD. *Sandra Balbino*, Associate professor
2. PhD. *Sanja Vidaček*, Associate professor
3. PhD. *Marina Krpan*, Assistant professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 24 July 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. HISTAMIN	2
2.1.1. Sinteza i metabolizam histamina	2
2.1.2. Histaminsko trovanje	3
2.1.3. Metode za analizu histamina	5
2.2. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA	7
2.3. SPEKTROSKOPIJA POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA (SERS)	9
2.3.1. Faktor pojačanja (EF)	11
2.3.2. SERS supstrati	11
2.3.2.1. Suspenzije metalnih nanočestica	12
2.3.2.2. Metalne nanostrukture na čvrstoj podlozi	12
2.3.3. Obrada i analiza SERS spektara	13
2.3.3.1. Korekcija pozadinskog signala	14
2.3.3.2. Korekcija šuma (izgladivanje spektra)	14
2.3.3.3. Normalizacija spektra	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Uzorci ribe	16
3.2. PLAN ISTRAŽIVANJA	17
3.3. METODE RADA	18
3.3.1. Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC)	18
3.3.2. Mjerenja provedena na Ramanovom spektrometru	18
3.3.3. SERS mjerenja na ekstraktima ribljeg mišićja	19
3.3.3.1. Priprema ekstrakata ribljeg mišićja za SERS mjerenja	19
3.3.3.2. Snimanje i analiza SERS spektara ekstrakata	20
3.3.4. Obrada SERS spektara	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. SERS ANALIZA	22
5. ZAKLJUČCI	34
6. LITERATURA	35

1. UVOD

Zbog nutritivnog značaja i pozitivnih učinaka na zdravlje ljudi u novije vrijeme sve se češće ističe važnost konzumiranja ribe u prehrani, i to posebice plave ribe. Međutim, uz konzumaciju plave ribe javljaju se potencijalni rizici koji mogu umanjiti zdravstvenu ispravnost ribe, a samim time i negativno utjecati na zdravlje potrošača, kao što je slučaj kod histaminskog trovanja.

Glavni uzročnik histaminskog trovanja je histamin koji se u ribi formira post-mortem bakterijskom dekarboksilacijom aminokiseline histidina uz pomoć bakterijskog enzima histidin-dekarboksilaze. Upravo zbog negativnog utjecaja na ljudsko zdravlje, histamin je jedan od najproučavanijih biogenih amina.

Do danas je razvijen veliki broj metoda za detekciju i kvantifikaciju histamina i drugih biogenih amina u ribi i proizvodima ribarstva.

Važnost kontrole zdravstvene ispravnosti ribe i ribljih proizvoda rezultirala je primjenom novih, brzih metoda za analizu histamina i drugih biogenih amina u ribi koje omogućuju jednostavnu primjenu i brzu analizu uzoraka uz prihvatljive troškove. Jedna od tih metoda je i Ramanova spektroskopija, vibracijska spektroskopska tehnika čije su glavne prednosti jednostavna priprema uzoraka te mogućnost *in situ* analize. Zasniva se na tzv. Ramanovom efektu, tj. na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s molekulom ispitivane tvari.

Zahvaljujući vrlo visokoj osjetljivosti, spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (eng. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) sve više nalazi primjenu u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti. Omogućuje pojačanje signala zahvaljujući efektima elektromagnetskog i kemijskog pojačanja.

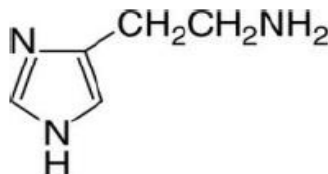
Budući da materijali koji se koriste kao SERS supstrati kao i njihova geometrija imaju važnu ulogu u efektu površinskog pojačanja, mnoga istraživanja usmjerena su u razvoj i karakterizaciju SERS supstrata. Najčešće korišteni SERS supstrati su zlato, srebro i bakar.

Cilj ovog rada je ispitati mogućnost primjene različitih postupaka pripreme uzoraka radi bržeg i jednostavnijeg provođenja SERS analize, a samim time i brže detekcije histamina u ribi. Na ovaj način olakšala bi se kontrola histamina u ribi i proizvodima ribarstva, i na vrijeme spriječilo histaminsko trovanje. Također, brža analiza osigurala bi visoku kvalitetu proizvoda i njihovu zdravstvenu ispravnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. HISTAMIN

Histamin (β -imidazol-etilamin) je biogeni amin, najčešći uzročnik trovanja povezanih s konzumacijom ribe i proizvoda ribarstva (Slika 1). Intoksikacija histaminom jedan je od najčešćih sanitarnih problema povezanih s visokim udjelom biogenih amina u ribi i ribljim proizvodima, stoga je jedan od najproučavanijih biogenih amina. Trovanje histaminom poznato je pod nazivom „skombroidno trovanje“ ili „skombrotoksizam“, a potječe od riba iz porodice *Scombridae* poput skuše i tune, koje su najčešće povezane s histaminskim trovanjem. Zajednička karakteristika navedenih vrsta ribe je visok sadržaj slobodne aminokiseline histidina čijom dekarboksilacijom nastaje histamin. Kasnija istraživanja povezala su histaminsko trovanje i s ribama iz drugih porodica poput lampuge (*Coryphaena spp.*), srdele (*Sardina pilchardus*), inćuna (*Engraulis spp.*), haringe (*Clupea spp.*), gofa (*Seriola spp.*), igluna (*Xiphias gladius*) i nekih vrsta lososa koje također sadrže visoke količine slobodnog histidina (Hungerford, 2010). S obzirom da su zabilježeni slučajevi u kojima je trovanje uzrokovano konzumacijom drugih vrsta riba, kao i drugim namirnicama, kao što su sir, vino i fermentirani mesni proizvodi, umjesto naziva „skombrotoksizam“ preferira se termin „histaminsko trovanje“ (Taylor i Lyons, 1984).



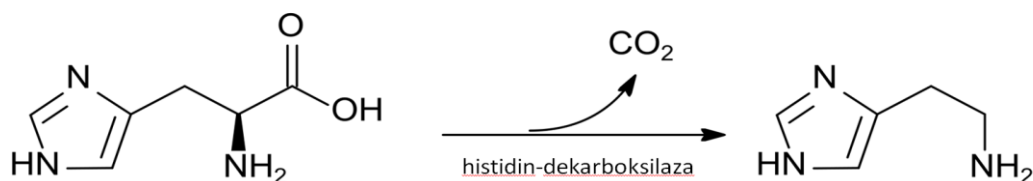
Slika 1. Kemijska struktura histamina (Flamini, 2008)

2.1.1. Sinteza i metabolizam histamina

Histamin u tkivu ribe nastaje bakterijskom dekarboksilacijom slobodne aminokiseline histidina pod djelovanjem bakterijskog enzima histidin – dekarboksilaze (Slika 2). Ovaj enzim je jedan od najvažnijih enzima u metabolizmu proteina, jer sudjeluje u pregradnji jedne od osam esencijalnih aminokiselina, histidina, koji se nalazi u sastavu većine proteinskih namirnica (Vranešić Bender i sur., 2010).

Nastanak histamina uglavnom je posljedica neadekvatnog rukovanja ribom, tj. skladištenja u uvjetima koji omogućuju mikrobiološku aktivnost. Bakterije stvaraju histamin u širokom temperaturnom rasponu. Optimalna temperatura za njegov nastanak je 20 - 25 °C, no brojna

istraživanja zabilježila su porast koncentracije histamina i pri temperaturama do +4°C kroz dulji period skladištenja (3 – 7 dana) (Kanki i sur., 2004; Emborg i Dalgaard, 2006). Rapidan rast histamina zabilježen je na temperaturi od 32,2°C, stoga se može reći da će se histamin prije razviti kao rezultat nepravilnog skladištenja na povišenoj temperaturi, nego dugotrajnog skladištenja na relativno nižoj temperaturi (Mendes, 2009). Prema nekim autorima histamin izdržava temperaturu od čak 200°C, što znači da ga temperatura sterilizacije ne može uništiti (Bogdanović i sur., 2009). Ako je u namirnici prisutan enzim histidin-dekarboksilaza koji nije u potpunosti inaktiviran što je čest slučaj kod smrzavanja i odmrzavanja te nedovoljne termičke obrade, pri čemu je aktivnost mikroorganizama smanjena ili eliminirana, moguć je nastanak histamina. Osim toga, zabilježeni su slučajevi nastanka histamina nakon otvaranja riblje konzerve, budući da prerađena riba i dalje sadrži velike količine slobodnog histidina. Histamin je termostabilan jednom kada je formiran, stoga se ne može ukloniti iz namirnice uobičajenim postupcima prerade. Kako je stvaranje histamina kod riba uvijek post-mortarno, stvaranje histamina bi stoga trebalo moći biti potpuno kontrolirano. No, situacija u svijetu je upravo suprotna jer je histamin najčešći uzrok intoksikacija uslijed konzumacije riba (Vidaček, 2013).



Slika 2. Metabolički put nastajanja histamina djelovanjem histidin – dekarboksilaze (Bogdanović i sur., 2009)

2.1.2. Histaminsko trovanje

Trovanje histaminom je vrlo čest problem koji se javlja širom svijeta. Ne zaobilazi ni najrazvijenije zemlje u kojima je zakonska regulativa i osiguranje kvalitete tijekom proizvodnje hrane na najvišoj razini. Prema podacima u literaturi osjetljivost konzumenata prema histaminu je izrazito individualna (Vusilović i sur., 2008). Ljudski organizam će tolerirati određenu količinu histamina bez ikakve reakcije. Uneseni histamin će se detoksificirati u probavnom sustavu uz pomoć enzima diaminoksidaze (DAO) i N-metiltransferaze (HMT). Ovaj zaštitni mehanizam prestaje djelovati, ako je unos histamina i/ili drugih biogenih amina vrlo visok ili ako su navedeni enzimi blokirani drugim tvarima. Vjerojatno inhibicija intestinalnog katabolizma histamina uzrokuje povećani prijenos histamina kroz stanične membrane te u krvotok (FAO, 1994).

Simptomi trovanja histaminom javljaju se vrlo brzo nakon konzumiranja ribe bogate histaminom u periodu od nekoliko minuta do 1 sat, ovisni su o dozi, a očituju se kao difuzno crvenilo lica i gornjeg dijela tijela uz pečenje i svrbež oko usta, crvenilo oko očiju, zatim znojenje, mučnina, povraćanje, grčevi u trbuhu, lupanje srca i pritisak u prsima (Taylor, 1986). Simptomi se mogu manifestirati i ovisno o osjetljivosti organizma konzumenta i nekim drugim parametrima. Često se simptomi histaminskog otrovanja ribom prilikom liječenja zamjenjuju sa simptomima alergije ili nekog drugog oblika otrovanja hranom. Kod težih slučajeva liječenje se provodi primjenom antihistaminika ili blokatora histaminskih receptora (Hungerford, 2010), međutim histaminsko trovanje uglavnom je blagog tijeka, te i bez tretiranja lijekovima prolazi samo od sebe već za nekoliko sati ne ostavljajući posljedice. Kako bi se spriječilo formiranje histamina u namirnici odnosno pojava histaminskog trovanja preporučuje se poštivanje načela dobre proizvođačke prakse i implementacija odgovarajućeg HACCP plana te stroga i učestala kontrola sirovine i proizvoda.

Od 15. studenoga 2005-te godine na snagu stupa Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu (Službeni list Europske unije, 2005), prema kojoj proizvodi od ribljih vrsta koje sadrže visoke koncentracije slobodnog histidina za 9 uzoraka po šarži moraju udovoljavati sljedećim uvjetima:

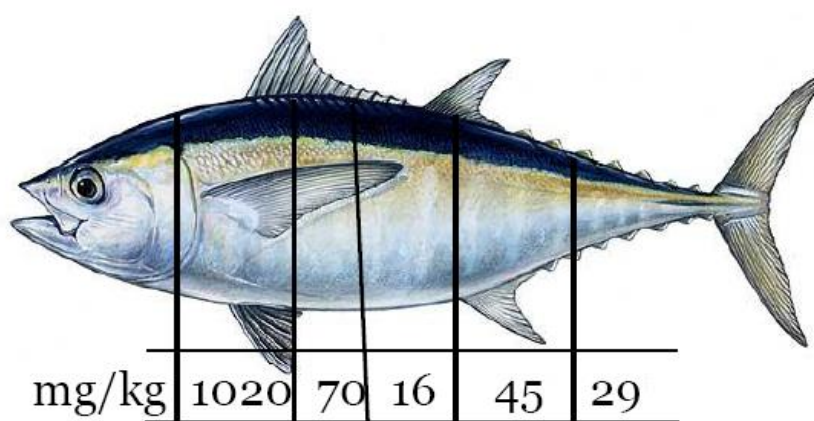
- Ustanovljena srednja vrijednost sadržaja histamina $\leq 100 \text{ mg kg}^{-1}$
- Maksimalno 2 uzorka smiju imati vrijednost sadržaja histamina između 100 i 200 mg kg^{-1}
- Niti jedan uzorak ne smije imati ustanovljenu vrijednost $\geq 200 \text{ mg kg}^{-1}$

Dvostruko veće dozvoljene vrijednosti od navedenih pokazali su proizvodi od istih ribljih vrsta koji su obrađeni enzimatskim dozrijevanjem u salamuri. Zakonska regulativa na području SAD-a je stroža pa njihov ured za kontrolu hrane i lijekova dopušta maksimalnu količinu od 50 mg kg^{-1} histamina, pri čemu se dodatno preporučuje primjena znanstvenih podataka za procjenu svježine ribe kao što je prisutnost drugih biogenih amina povezanih s kvarenjem ribe (FDA, 2011).

Budući da histamin nije homogeno raspoređen u cijeloj šarži ili ulovu ribe, izuzetno je važan adekvatan plan uzorkovanja prilikom određivanja količine histamina. To najviše dolazi do izražaja prilikom velikih ulova sitne plave ribe koji se ne mogu dovoljno brzo polediti i rashladiti na ribarskom brodu. Događa se da riba koja je poledena netom nakon ulova izvrzne kvalitete, dok riba koja je poledena posljednja uslijed visoke temperature okoliša postaje kontaminirana kao posljedica nastanka histamina. Iz tog razloga potrebno je pravilno uzorkovanje kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu što iziskuje relativno velik broj uzoraka i analiza.

Histamin nije homogeno raspoređen niti u tkivu ribe što je čest slučaj kod velikih riba poput tune ili igluna. Najveći broj mikroorganizama prisutan je na škrgama i u probavnom traktu ribe (Slika 3) gdje kvarenje prvo započinje i gdje se najbrže odvija tako da nepravilno uzorkovanje može dati pogrešan rezultat. Primjerice konzerve tune proizvedene od iste ribe mogu sadržavati proizvode koji su zdravstveno ispravni zajedno s onima koji sadrže visoke količine histamina.

Široka rasprostranjenost histaminskog trovanja diljem svijeta vjerojatno je posljedica neusklađenosti zakonske regulative na svjetskom nivou te relativno složenim metodama kontrole sadržaja histamina u proizvodima ribarstva.



Slika 3. Raspoređenost histamina u tijelu ribe (Frank i sur., 1981)

2.1.3. Metode za analizu histamina

S obzirom da je histamin jedan od najvažnijih toksičnih biogenih amina prisutan u ribi postoji velika potreba za pouzdanim i efikasnim metodama za detekciju i kvantifikaciju histamina ali i drugih biogenih amina u ribi i proizvodima ribarstva. Korištenje ovih metoda može pomoći u ranijem otkrivanju navedenih spojeva u proizvodnom lancu. Do sada je razvijen veliki broj analitičkih metoda za određivanje histamina od kojih svaka metoda ima svoje prednosti, ali i neke nedostatke. Senzorska analiza svježine ribe je uobičajena i najčešća metoda kontrole koja se koristi prilikom prijema ribe na preradu. Riba se svrstava u određenu kategoriju kvalitete s obzirom na određene senzorske parametre kao što su izgled kože, očiju, škrga, miris, tvrdoća i tekstura mesa, na temelju čega se određuje njena prikladnost za preradu. Navedena metoda nije pouzdana kada se želi procijeniti sadržaj histamina jer se u specifičnim slučajevima, kao npr. kod izlaganja ribe visokim temperaturama, histamin može razviti prije nego senzorski parametri mogu detektirati kvarenje ribe. Kontrola temperature i vremena od ulova do prijema ribe na preradu također se često primjenjuje u industriji. Na osnovu pregleda termografskih lista i evidencije ulova množe se vrijednosti

temperature i vremena koje je riba provela na određenoj temperaturi. Ako je $t \times T$ vrijednost < 150 h°C smatra se da je riba prikladna za preradu. Glavni nedostatak ove metode je što daje grube orijentacijske vrijednosti pa nije adekvatna za precizno određivanje količine histamina u ribi.

Zbog važnosti problema histaminskog trovanja razvijen je velik broj laboratorijskih analitičkih metoda za analizu histamina koje se uglavnom temelje na kromatografskim postupcima. Najčešće primjenjivana metoda za analizu histamina je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) pri kojoj se histamin ekstrahira iz tkiva ribe pogodnim otapalom nakon čega je potrebno provesti derivatizaciju (reakcija s reagensom pri čemu nastaje kompleks koji ima izraženu apsorpciju svjetlosti (u UV dijelu spektra) koji se nakon separacije na kromatografskoj koloni može detektirati pomoću DAD ili UV detektora. Metoda koju su razvili Malle i sur. (1996) također pripada ovoj skupini metoda, a uredba EZ 2073/2005 ju navodi kao referentnu metodu za određivanje udjela histamina u proizvodima ribarstva. U ostale skupine laboratorijskih metoda pripadaju ionska kromatografija, tankoslojna kromatografija, kapilarna elektroforeza, fluorometrijske metode, plinska kromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS) i tekućinska kromatografiju s masenom spektrometrijom (LC-MS). Robusnost, ponovljivost, preciznost i točnost glavne su prednosti laboratorijskih metoda. Za sve ove metode postupak pripreme uzoraka vrlo je složen i dugotrajan te u realnom vremenu nije moguće analizirati dovoljan broj uzoraka kako bi se dobio reprezentativan rezultat za cijelu šaržu ribe.

S ciljem lakše kontrole sadržaja histamina u industriji, razvijeno je nekoliko "brzih" metoda za određivanje histamina koje se uglavnom baziraju na različitim enzimatskim metodama (ELISA).

Oprema potrebna za provođenje ovih metoda podrazumijeva različite kvalitativne i kvantitativne kitove sa potrebnim reagensima i spektrofotometar kojim se po završetku reakcije može očitati intenzitet boje na osnovu čega se dobiva podatak o količini histamina u uzorku. Različiti postupci pripreme uzoraka unatoč prijenosnim kitovima, smanjena točnost pri određivanju histamina u proizvodima dobivenim soljenjem i dozrijevanjem u salamuri kao i neprikladnost za analize van laboratorija glavni su nedostaci ovih metoda. U Tablici 1. prikazana je usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina.

Tablica 1. Usporedba najčešće korištenih metoda za analizu histamina (FAO / WHO, 2013)

	AOAC metoda	HPLC metode	Spektrofluorometrijske metode	ELISA	Kolorimetrijske metode
Vrijeme potrebno za 1 test	1 – 2 h	1 – 2 h	1 h	1 h	1 h
Oprema	Fluorometar	HPLC	Spektrofluorometar	Spektrofotometar	Spektrofotometar
Prag kvantifikacije	1 – 5 ppm	1.5 – 5 ppm	1.5 ppb	2 – 5 ppm	20 ppm
Raspon	1 – 150 ppm	5 – 2500 ppm	1.5 ppb – 100 ppm	0 – 500 ppm	0.8 – 300 ppm
Prednosti metode	Robusnost, ponovljivost, točnost, preciznost	Analiza svih biogenih amina, točnost, preciznost	Točnost, preciznost, cijena	Jednostavnost (kit), cijena, više testova istovremeno	Jednostavnost, cijena, više testova istovremeno, jednostavna kalibracija

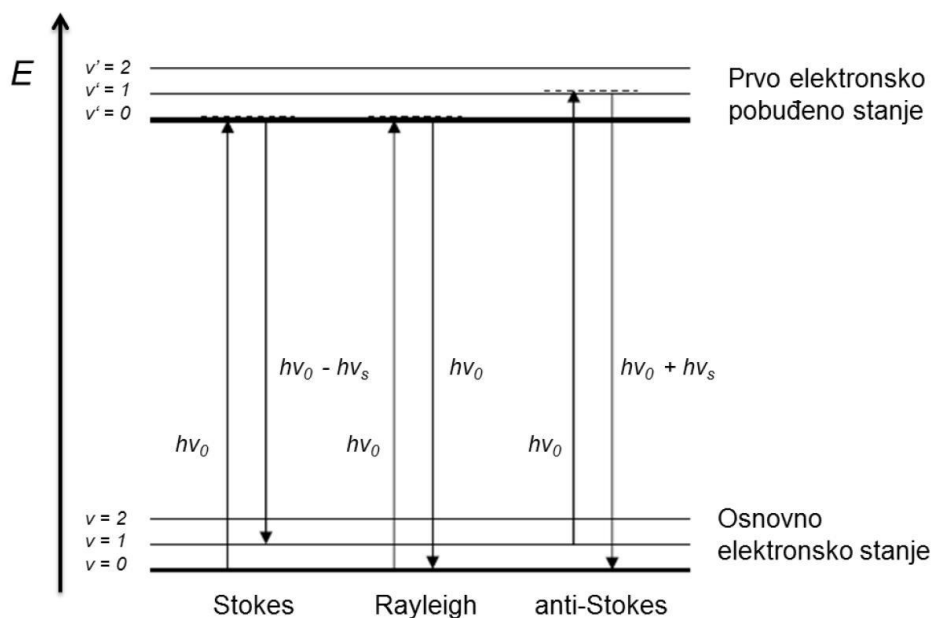
Osim navedenih metoda analize histamina intenzivno se istražuje mogućnost primjene Raman spektroskopije za analizu histamina u ribi i proizvodima od ribe. Javlja se potreba za novim, "brzim" metodama za analizu histamina koje bi bile jednostavne za primjenu i koje bi omogućile bolju kontrolu velikog broja uzoraka u kratkom vremenu uz prihvatljive troškove.

2.2. RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA

Ramanova spektroskopija je vibracijska spektroskopska tehnika. Temelji se na neelastičnom raspršenju elektromagnetskog zračenja uslijed interakcije s vibracijskim modovima molekule (Long, 2002; Ferraro, 2003). Vibracije molekula aktivnih u Ramanovom spektru su one pri kojima se mijenja polarizabilnost molekule.

Interakcijom fotona i molekule dolazi do polarizacije elektronskog oblaka, tj. pobude u virtualna energetska stanja. Molekula se u vrlo kratkom vremenu (10^{-14} s) vraća u osnovno stanje otpuštajući foton. Elastično raspršenje zračenja pri kojem ne dolazi do promjene energije, tj. valne duljine pobudnog i raspršenog zračenja naziva se Rayleighovo raspršenje. Ramanovo raspršenje predstavlja neelastično raspršenje pri kojem se valna duljina raspršenog zračenja razlikuje od valne duljine pobudnog zračenja. Kod Ramanovog raspršenja, emitirani foton može imati manju ili veću valnu duljinu od pobudnog fotona. Ukoliko je početni vibracijski nivo molekule u osnovnom

elektronskom stanju niži od vibracijskog nivoa u koji se molekula vraća nakon emisije fotona, emitirani foton je veće valne duljine od pobudnog fotona te se radi o Stokesovom raspršenju. Ako je molekula već na početku u višem vibracijskom stanju, a nakon raspršenja se vraća u osnovno stanje, raspršeni foton ima veću energiju pa zato i manju valnu duljinu pa se ovaj efekt naziva anti-Stokesovo raspršenje (Janči, 2016) (Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz različitih tipova raspršenja svjetlosti na molekuli pobuđenoj fotonom (Vandenabeele, 2013)

Pojava Ramanovog raspršenja vrlo je slabog intenziteta i manje vjerojatna od Rayleighovog raspršenja. Tek je jedan od 10^7 fotona Stokes raspršen, dok je u pravilu na svakih 10 000 upadnih fotona jedan foton Rayleigh raspršen (Singh, 2002). Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje pomaknuto je na jednaku udaljenost, ali na suprotne strane Rayleighovog raspršenja. Stoga su i njihovi spektri molekule simetrični u odnosu na valnu duljinu pobudnog zračenja pri čemu je anti-Stokesov spektar manjeg intenziteta. U Ramanovoj spektroskopiji uobičajeno je prikazivati samo Stokesovu polovicu spektra zbog jačih intenziteta.

Ramanov spektar karakterističan je za određenu molekulu (jedinostveni vibracijski spektar = *fingerprint* molekule). Dobiva se snimanjem intenziteta raspršene svjetlosti u odnosu na valnu duljinu ili frekvenciju. Svaki vibracijski mod molekule daje karakterističan pomak frekvencije, a broj modova molekule s N atoma izračunava se pomoću izraza $n = 3N - 6$ za nelinearne molekule te $n = 3N - 5$ za linearne molekule. Kod vibracije polarnih veza (N-O, C-O, O-H) javlja se slabije

Ramanovo raspršenje jer se promjenom njezine duljine, tijekom vibracije, ne povećava značajno efekt promjene polarizacije iz razloga što takve veze imaju same po sebi jaku polarizaciju. Što je veza manje polarna, tijekom vibracije doživljava veću promjenu polarizabilnosti pa je samim time i raspršenje jače (Janči, 2016).

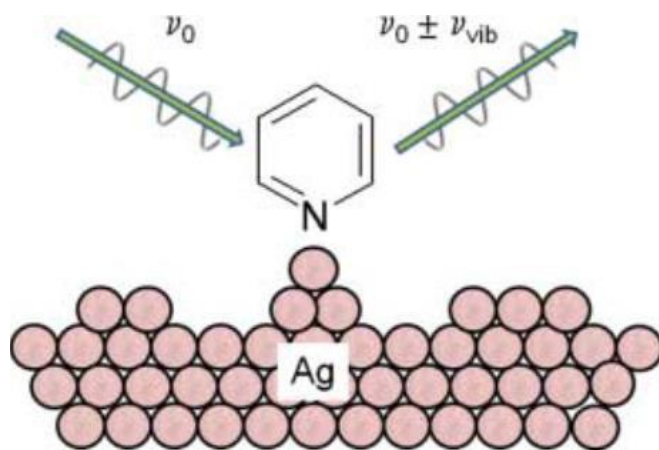
Ramanov spektar može se upotrijebiti za identifikaciju, u određenim slučajevima i kvantifikaciju pojedinog analita. Ramanovo raspršenje daje slab signal pa je potrebna velika snaga izvora svjetlosti koja vrlo često dovodi do degradacije uzorka te onemogućava njegovu analizu. Također, može doći do apsorpcije zračenja, ukoliko je energija pobudnog zračenja dovoljna za prijelaz između elektronskih stanja molekula. Pri povratku u osnovno elektronsko stanje, apsorbirana energija se otpušta u obliku topline i/ili zračenja. U Raman spektroskopiji fluorescencija je vrlo česta pojava te ometa analizu jer može u potpunosti zasjeniti Stokesovo raspršenje. Dolazi do pojave fotodegradacije uzorka i fluorescencije koji ograničavaju maksimalnu snagu izvora svjetlosti. Prilikom analize proteina ili nukleinskih kiselina Raman spektroskopija zahtjeva relativno visoku koncentraciju analita u uzorku (Peticolas, 1995).

U novije vrijeme Ramanova spektroskopija postala je vrlo važna metoda s mnogim područjima primjene čije su glavne prednosti jednostavna priprema uzoraka te mogućnost *in situ* analize.

Rezonantna Ramanova spektroskopija (RRS) i spektroskopija površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (SERS) koriste se za povećanje intenzita signala, tj. osjetljivosti Ramanove spektroskopije (Mathies, 1995).

2.3. SPEKTROSKOPIJA POVRŠINSKI POJAČANOG RAMANOVOG RASPRŠENJA (SERS)

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje (eng. *Surface-Enhanced Raman Scattering*, SERS) je metoda kod koje dolazi do povećanja presjeka Ramanovog raspršenja na molekulama adsorbiranim na ili u neposrednoj blizini metalnih nanostrukture (SERS supstrati), što ima za posljedicu pojačanje Ramanovog signala (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz SERS efekta na primjeru molekule piridina adsorbirane na srebro (McQuillan, 2009)

1974-te godine kada je primijećeno da je Ramanov spektar molekule piridina adsorbirane na površinu hrapave srebrne elektrode neobično visokog intenziteta, otkriven je efekt površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (Fleischmann i sur., 1974, McQuillan, 2009). Ponuđena su teorijska objašnjenja ovog fenomena (Albrecht i Creighton, 1977; Jeanmaire i Van Duyne, 1977), a istraživanja su se proširila i na primjenu drugih metala kao što su zlato, platina, bakar, aluminij i alkalijski metali u ove svrhe. Daljnjim istraživanjem povećanje Ramanovog presjeka molekule pripisalo se pobudi površinskih plazmona na hrapavoj površini elektrode (Moskovits, 1978).

Mogućnost detekcije analita u vrlo niskim koncentracijama kao i primjenjivost u brojnim granama prirodnih i tehničkih znanosti glavne su prednosti ove tehnike.

Osim izrazitog pojačanja Ramanovog raspršenja SERS metoda ima sposobnost eliminacije fluorescencije uslijed prijenosa energije s molekule na metal (Etchegoin i Le Ru, 2010). Sve navedeno čini je idealnom tehnikom za istraživanje i analizu različitih kemijskih i bioloških uzoraka.

Kod primjene SERS spektroskopije ograničavajući faktori su optimizacija parametara pripreme uzorka i samog mjerenja, točno određeni supstrati koji su prilagođeni ciljanom analitu te osiguravaju visoku osjetljivost i ponovljivost mjerenja i smanjenje interferencija drugih komponenti u uzorku.

Površinski pojačano Ramanovo raspršenje prilično je složeno i vrlo aktivno područje istraživanja, međutim sam mehanizam pojačanja raspršenog zračenja još uvijek nije sasvim razjašnjen.

Postoje dvije opće prihvaćene teorije koje objašnjavaju fenomen pojačanja raspršenja: elektromagnetski mehanizam i mehanizam prijenosa naboja, pri čemu se smatra da elektromagnetsko pojačanje značajnije doprinosi ukupnom pojačanju (McNay i sur., 2011). Kod

elektromagnetskog mehanizma pojačanja molekula je u blizini metalne površine pod utjecajem znatno snažnijeg električnog polja, dok se kemijski mehanizam temelji na promjeni polarizabilnosti zbog interakcije molekule i metalne površine (Yuen i sur., 2008).

Elektromagnetski mehanizam ne zahtijeva direktnu vezu analita i metalne površine kako bi se opazio SERS signal, već smještanje molekule u neposrednu blizinu površine metala. Zahvaljujući tome, moguće je proizvesti funkcionalizirane SERS supstrate koji na svojoj površini imaju vezane molekule receptore. Njihova funkcija je specifično vezanje molekula analita i smještanje u neposrednu blizinu SERS supstrata (Dick i sur., 2000).

2.3.1. Faktor pojačanja (EF)

Zbog potrebe definiranja učinkovitosti različitih supstrata te njihove međusobne usporedbe predložen je način izračuna faktora pojačanja (eng. *enhancement factor*, EF) (Kleinman i sur., 2013). U praksi se zbog jednostavnosti često primjenjuje eksperimentalno određivanje faktora pojačanja za razliku od teorijskog izračuna faktora pojačanja. Pojednostavljeni prikaz faktora pojačanja određenog SERS sustava može se opisati sljedećom jednačinom:

$$EF_{SERS} = \frac{I_{SERS} / N_{SERS}}{I_{NRS} / N_{NRS}} \quad (1)$$

pri čemu su I_{SERS} i I_{NRS} intenziteti u SERS i normalnoj Ramanovoj spektroskopiji, N_{SERS} broj molekula na površini SERS supstrata, a N_{NRS} broj molekula u mjerenom volumenu analita.

2.3.2. SERS supstrati

Paralelno s razvojem SERS spektroskopije razvijale su se i različite tehnike pripreme pogodnih metalnih SERS supstrata. Pod pojmom SERS supstrat podrazumijeva se bilo koja metalna nanostruktura koja omogućuje površinsko pojačanje Ramanovog raspršenja. Prvi SERS supstrat bila je srebrna elektroda nepravilne površine, pripravljena elektrokemijski, cikličkom voltametrijom (Fleischmann i sur., 1974). Od otkrića SERS efekta do danas razvijen je velik broj različitih supstrata koji se mogu podijeliti na: metalne nanočestice u suspenziji (npr. koloidne otopine), metalne elektrode i planarne metalne nanostrukture na krutoj podlozi.

2.3.2.1. Suspenzije metalnih nanočestica

Suspenzije metalnih nanočestica najčešće su korišteni i najbolje istraženi SERS supstrati zbog jednostavnosti njihove pripreme uz relativno niske troškove i jednostavnu opremu te zbog dobrog faktora pojačanja i stabilnosti. Nedostatak je što nisu visoko sofisticirani, međutim ovi SERS supstrati imaju sposobnost postizanja velikih faktora pojačanja.

Koloidne suspenzije metalnih nanočestica nastaju redukcijom metalnih soli u otopini uz dodatak redukcijskog i stabilizacijskog sredstva pri čemu metalne nanočestice imaju različit oblik i dimenzije ovisno o uvjetima i metodi pripreme. Parametri koji se pritom uzimaju u obzir su vrsta metala, redukcijsko sredstvo, temperatura i koncentracija metalnih iona. Također, sintetizirane nanočestice će ovisno o veličini, obliku i dielektričnim svojstvima korištenog metala imati različito područje plazmonske rezonancije (Aroca i sur., 2005).

Do danas je razvijen veliki broj različitih nanočestica na bazi jednog ili kombinacije različitih metala poput: Cu (García-Rodríguez i sur., 1998; Sánchez-Cortés i García-Ramos, 2000), Au-Pt (Lu i sur., 2004; Takenaka i Eda, 1985; Cao i sur., 2004), Ag-Rh (Feilchenfeld i sur., 1992), Pd (Srnová i sur., 1997) ili Au-Pd (Park i sur., 2002), no ipak najbolji rezultati se postižu upotrebom koloidnih nanočestica na bazi srebra ili zlata.

Redukcija srebrovog nitrata ili sulfata najčešće se koristi za sintezu srebrnih koloida, a za sintezu zlatnih koloida vodikov ili kalijev tetrakloraurat. U reakcijsku smjesu se dodaju redukcijsko sredstvo i različita stabilizirajuća sredstva čija je uloga sprječavanje agregacije i sedimentacije koloidnih nanočestica tijekom skladištenja odnosno elektrostatska ili sterička stabilizacija koloidne otopine.

Nestabilna koloidna suspenzija je nepoželjna tijekom snimanja SERS spektara jer rezultira slabom ponovljivosti uslijed rezultata koji se mijenjaju tijekom vremena zbog agregacije i sedimentacije SERS supstrata. Isto tako faktori pojačanja malih agregata nanočestica znatno su veći u usporedbi s faktorom pojačanja pojedine nanočestice. Zbog toga se neposredno prije SERS analize provodi agregacija koloida koja zahtjeva pažljivo optimiziranje uvjeta i kontrolu procesa agregacije kako bi se izbjegli pogrešni rezultati i potpuna precipitacija koloida (Le Ru i Etchegoin, 2009).

2.3.2.2. Metalne nanostrukture na čvrstoj podlozi

Depozicija nanočestica iz suspenzije na krutu podlogu predstavlja najjednostavniji tip krutih SERS supstrata. Najčešći postupci depozicije podrazumijevaju sušenje kapi koloidne suspenzije na

krutoj podlozi, namakanje podloge u koloidnoj suspenziji, imobilizaciju nanočestica na filterskim membranama (Yu i White, 2012), ink-jet printanje (Yu i White, 2010) i sitotisak (Qu i sur., 2012). Njihov glavni nedostatak je nasumična depozicija koja rezultira nejednolikom strukturom površine krutog supstrata. Kao takvi ne rješavaju problem ponovljivosti mjerenja. Bolje rezultate pokazale su metode samoorganizacije i usmjerene organizacije nanočestica na površini krute podloge (Kho i sur., 2005; Tao i sur., 2007).

Elektrode koje se koriste kao SERS supstrati moraju imati hrapavu površinu što se postiže različitim elektrokemijskim procesima. Pritom ukupna hrapavost ovisi o uvjetima elektrokemijskog postupka obrade. Hrapavost može značajno varirati duž površine elektrode što dovodi do varijabilnosti rezultata (Sauer i sur., 2000).

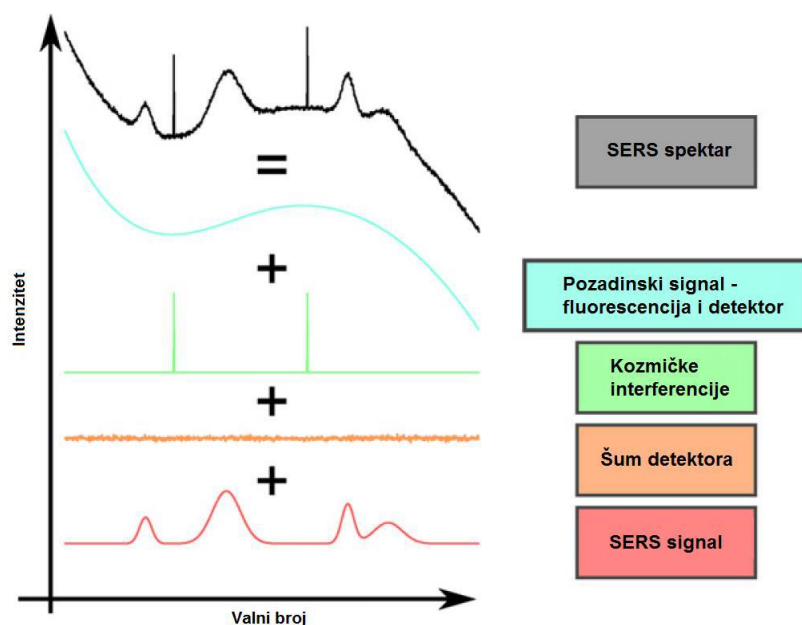
U pogledu ponovljivosti učinkovitiji rezultati postižu se različitim supstratima dobivenim naparavanjem tankog sloja metala na nanostrukturiranu krutu podlogu. Tzv. „otoci metalnih filmova“ (eng. *metal island films*) najjednostavniji su supstrati iz ove skupine. Dobivaju se naparavanjem tankog sloja metala (< 20 nm) na krutu podlogu pri čemu nastaje diskontinuirani sloj metala, tj. otoci metalnog filma koji uzrokuju pojačanje raspršenja.

Faktor pojačanja ovakvih supstrata smanjuje se s povećanjem debljine metalnog sloja. Razlog tome je što se „otoci“ spajaju čime se smanjuje broj neravnina na površini. Kod ovog tipa supstrata zabilježeni su manji faktori pojačanja u odnosu na koloidne SERS supstrate (Janči, 2016).

2.3.3. Obrada i analiza SERS spektara

Interpretacija i upotreba SERS spektra može biti vrlo složena, posebice za kvantitativne analize. Uz signale analita SERS spektar sadrži i brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, fluorescencije, kozmičkih interferencija koje nastaju od čestica visoke energije koje registrira detektor te šuma i pozadinskog signala samog detektora (Slika 6).

Apsolutna vrijednost intenziteta SERS spektra ovisna je o brojnim faktorima kao što su pomicanje optičkih elemenata instrumenta uslijed vibracija, oscilacije snage lasera itd. Navedene faktore tijekom izvođenja eksperimenta često nije moguće kontrolirati, te ih je potrebno predobradom spektara eliminirati kako bi se dobili zadovoljavajući rezultati.



Slika 6. Komponente SERS spektra (Bocklitz i sur., 2011)

2.3.3.1. Korekcija pozadinskog signala

Za eliminaciju pozadinskog signala iz SERS spektra uzorka postoji više matematičkih metoda koje se temelje na različitim teoretskim pristupima problemu (Schulze i sur., 2005). Neke od tih metoda su procjena pozadinskog signala SNIP algoritmom, prilagođavanje polinoma višeg reda spektru, valne transformacije te izračun prve ili druge derivacije spektra.

Zajednička karakteristika ovim metodama je izrazita ovisnost o odabranim parametrima izračuna koji se moraju odrediti na način da se uz minimalne promjene SERS signala u snimljenom spektru eliminira pozadinski signal. Vrlo učinkovita metoda eliminacije pozadinskog signala bez sustavne pogreške je derivacija spektra koja zahtijeva složene matematičke algoritme za reprodukciju normalnog oblika spektra (Mosier-Boss i sur., 1995). Najčešće korištena metoda pri obradi SERS spektra je metoda prilagođavanja polinoma spektru.

2.3.3.2. Korekcija šuma (izgladivanje spektra)

S ciljem postizanja boljeg omjera signala i šuma, spektar je potrebno izgladiti primjenom tzv. digitalnih filtera ili prozorske funkcije (eng. *window functions*). Za početak je potrebno definirati funkciju koja ovisno o namjeni može biti srednja vrijednost, prilagođavanje polinoma, derivacija itd., te veličinu prozora, tj. broj točaka koje funkcija obrađuje u jednom koraku. Pokretanjem algoritma, funkcija na temelju vrijednosti izračunava novu vrijednost unutar prozora i pripisuje je

centralnoj točki prozora izglađenog spektra. Na taj način pomiče se za jedno mjesto dalje, sve do kraja spektra. U pravilu vrijedi što je veći prozor to će spektar biti više izglađen.

Valja napomenuti da s upotrebom digitalnih filtera treba biti oprezan jer u slučaju pretjeranog izglađivanja spektra može doći do gubitka vrpci niskog intenziteta te proširivanja ili pomaka SERS vrpci u spektru (Vandenabeele, 2013).

2.3.3.3. Normalizacija spektra

Normalizacija spektra je postupak kojim se eliminiraju oscilacije apsolutnog intenziteta SERS spektra. Poznate su brojne metode normalizacije spektra koje uključuju normalizaciju prema minimalnoj i maksimalnoj vrijednosti pri čemu se maksimalnoj vrijednosti intenziteta pridodaje vrijednost 1, a minimalnoj 0, normalizacije dijeljenjem intenziteta u svakoj točki spektra sa sumom intenziteta svih točaka u spektru itd. U kemometrijskim proračunima često se koristi normalizacija metodom normalne standardne varijable koja srednjoj vrijednosti intenziteta spektra daje vrijednost 0, dok se normalizirani intenzitet definira formulom:

$$I_{norm} = \frac{I_{original} - \mu_I}{SD_I} \quad (2)$$

pri čemu je μ_I srednja vrijednost originalnog spektra, a SD_I standardna devijacija intenziteta u spektru.

Upotreba internog standarda poželjna je kod kvantitativnih analiza pri čemu je najbolja metoda normalizacija cijelog spektra na osnovu intenziteta vrpci internog standarda (Bocklitz i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

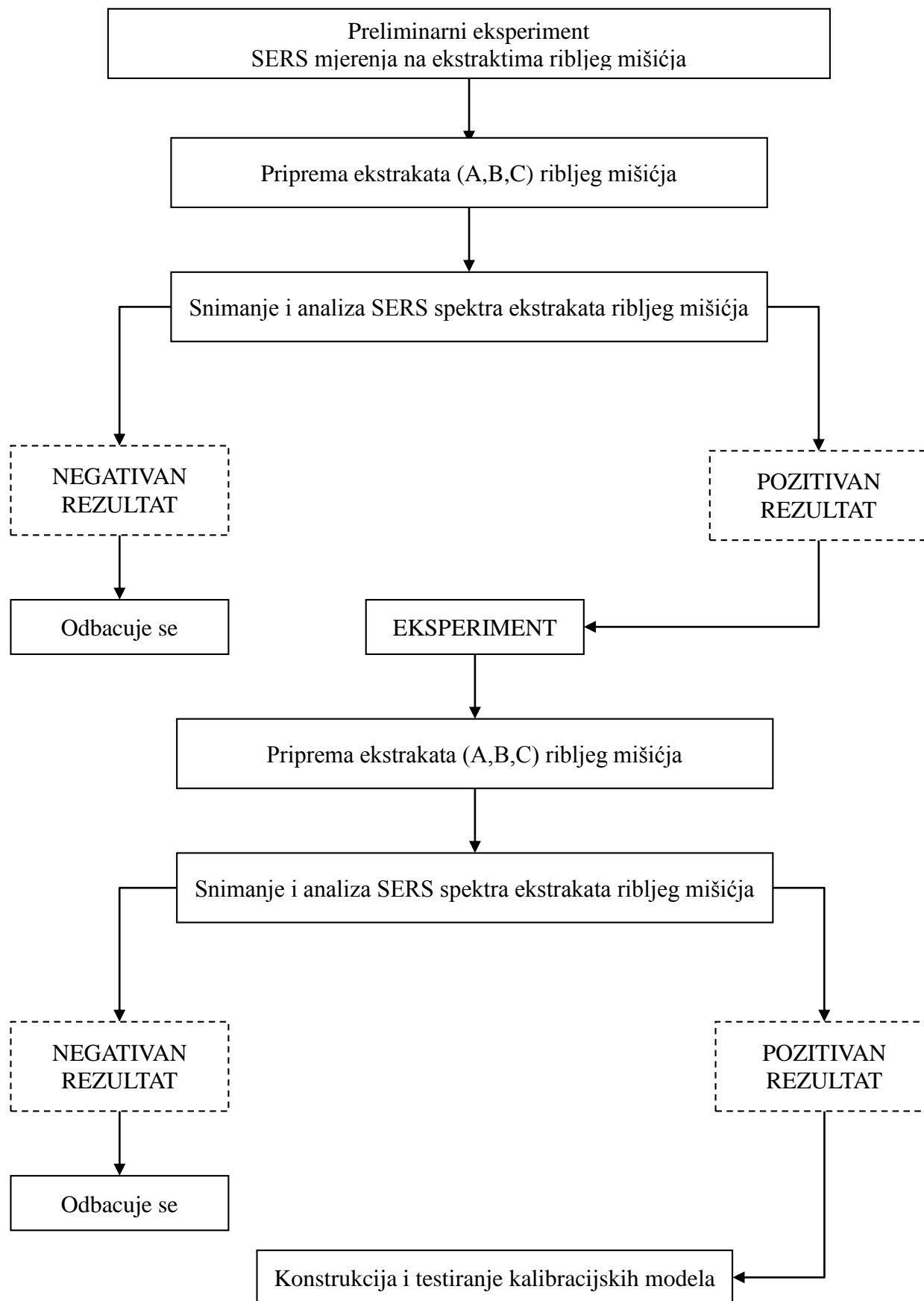
- Srebrov nitrat, p.a. (Kemika)
- Trinatrijev citrat dihidrat, p.a. (Kemika)
- Natrijev borhidrid, p.a. (Carlo Erba)
- Natrijev hidroksid, p.a. (Kemika)
- Natrijev klorid, p.a. (Kemika)
- Histamin dihidroklorid, p.a. (Sigma-Aldrich)
- Perkloratna kiselina, p.a. (Kemika)
- 1-butanol, p.a. (Kemika)

Sve korištene kemikalije bile su analitičkog stupnja čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja. U svim pokusima korištena je deionizirana voda otpornosti 18 MΩcm.

3.1.2. Uzorci ribe

Uzorci svježe palamide (*Sarda sarda*) nabavljeni su na ribarnici te su u poledenom stanju prevezeni u laboratorij. RIBE su eviscerirane i filetirane te su uklonjene koža i kosti, a mišićno tkivo je usitnjeno i homogenizirano ručnim sjekačem (mikserom). Ovako pripremljeni uzorci korišteni su za pripremu ekstrakata za daljnje analize.

3.2. PLAN ISTRAŽIVANJA



Slika 7. Plan istraživanja – SERS mjerenja na ekstraktima ribljeg mišićja

3.3. METODE RADA

3.3.1. Priprema srebrnih nanočestica korištenjem citrata (AGC)

Prema modificiranom Lee - Meiselovom postupku (Lee i Meisel, 1982) pripremljena je koloidna suspenzija srebra AGC redukcijom srebrovog nitrata s trinatrijevim citratom. U 500 mL deionizirane vode otopljeno je 90 mg srebrovog nitrata i zagrijano do vrenja (120 °C) u trogloj tikvici koja se nalazila na uljnoj kupelji. 50 mL 1%-tne otopine trinatrijevog citrata dodano je u vruću otopinu te je reakcijska smjesa intenzivno miješana 90 minuta uz refluks i propuhivanje dušikom. Otopina je potom ostavljena da se hladi do sobne temperature uz konstantno miješanje.

3.3.2. Mjerenja provedena na Ramanovom spektrometru

Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi, Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanovim spektrometrom (Slika 8) opremljenim argonskim laserima koji emitiraju zračenje pri valnim duljinama 488 i 514,5 nm te diodnim laserom valne duljine zračenja 532 nm. Spektrometar je baždaren pomoću Ramanove vrpce transversalnog optičkog moda silicijske pločice površinske orijentacije $\langle 111 \rangle$ na $520,7 \text{ cm}^{-1}$.

Na tekućim uzorcima mjerenja su provedena u staklenim kapilarama promjera 2 mm smještenim u „makro“ komoru spektrometra. Laserska zraka bila je fokusirana lećom od 100 mm u 90° geometriji, a snaga lasera na uzorku iznosila je oko 60 mW.



Slika 8. Horiba Jobin Yvon T64000 Ramanov spektrometar, Laboratorij za molekulsku fiziku
Instituta Ruđer Bošković

3.3.3. SERS mjerenja na ekstraktima ribljeg mišićja

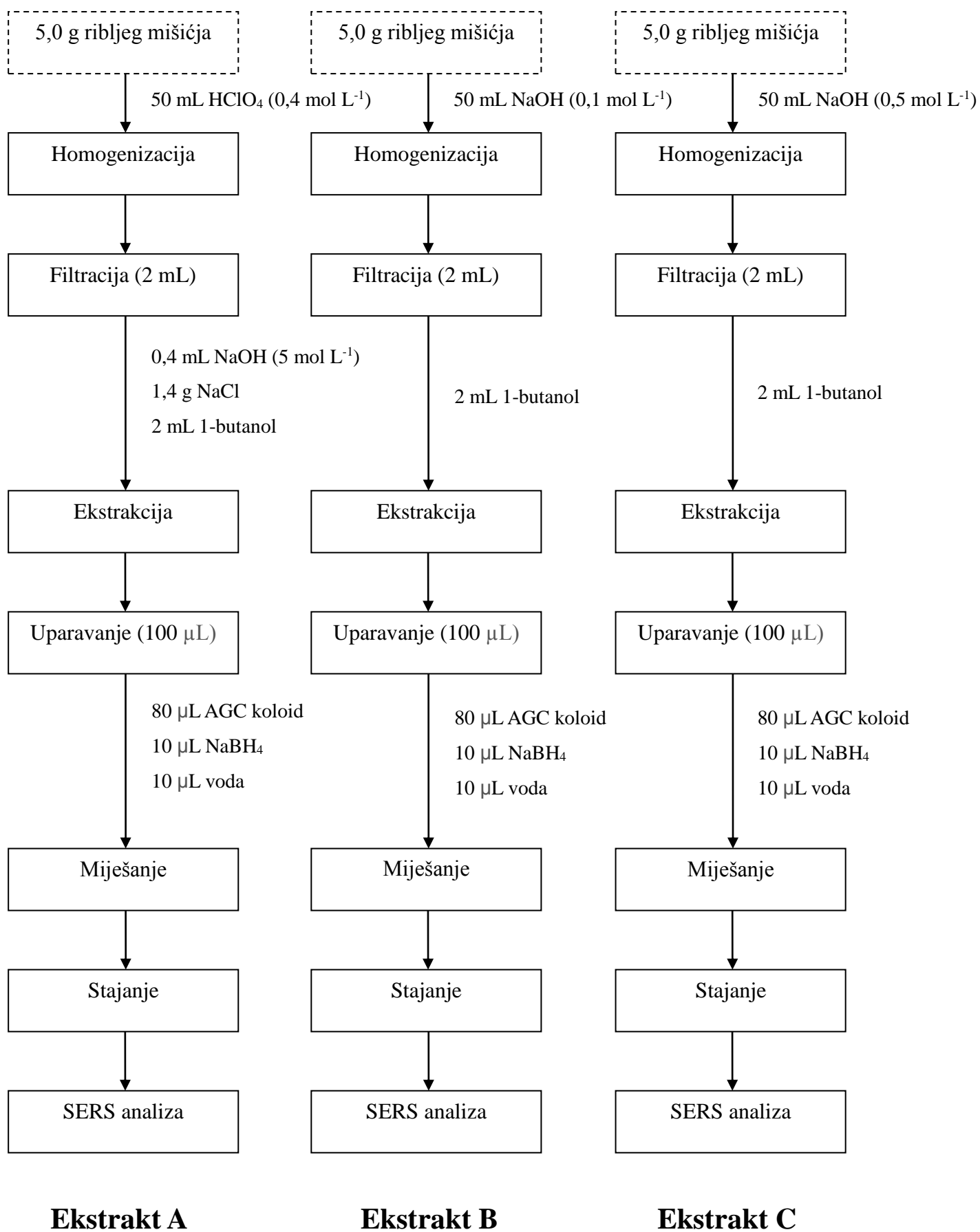
3.3.3.1. Priprema ekstrakata ribljeg mišićja za SERS mjerenja

U kivete volumena 50 mL odvagano je 5 g usitnjenog ribljeg mišićja kojem je dodan histamin dihidroklorid kako bi se postigle koncentracije od 0, 75, 100, 150, 200, 225, 300, 400 mg kg⁻¹ ribljeg mišićja. Pripremljeni su i uzorci za provjeru na način da je u kivete volumena 50 mL odvagano 5 g usitnjenog ribljeg mišićja u kojem se već razvio histamin kao posljedica kvarenja ribe. Ovako pripremljeni uzorci podvrgnuti su sljedećim postupcima ekstrakcije i pročišćavanja:

Ekstrakt A pripremljen je prema metodi Janči i sur. (2017), homogeniziranjem uzorka u 50 mL HClO₄ (0,4 mol L⁻¹) na laboratorijskom homogenizatoru tijekom 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenat je filtriran kroz Whatman 4 filter papir te je 2 mL filtrata prebačeno u staklenu epruvetu sa čepom. Potom je u epruvetu dodano 1,4 g NaCl, 0,4 mL 5 M NaOH i 2 mL 1-butanola, epruveta je začepljena i ekstrakt je miješan na laboratorijskoj tresilici 10 min pri 70 rpm. Po završetku ekstrakcije 1-butanolom, uzorak je ostavljen 2 min da se odvoje slojevi. 100 µL gornjeg butanolnog sloja pipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL te je upareno do suhog u struji dušika pri temperaturi 60°C.

Ekstrakt B pripremljen je homogeniziranjem uzorka u 50 mL NaOH (0,1 mol L⁻¹) zasićene s NaCl na laboratorijskom homogenizatoru tijekom 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenat je filtriran kroz Whatman 4 filter papir te je 2 mL filtrata prebačeno u staklenu epruvetu sa čepom. U epruvetu je dodano 2 mL 1-butanola, nakon čega je epruveta začepljena i ekstrakt je miješan na laboratorijskoj tresilici 10 min pri 70 rpm. Po završetku ekstrakcije 1-butanolom, uzorak je ostavljen 2 min da se odvoje slojevi. 100 µL gornjeg butanolnog sloja pipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL te je upareno do suhog u struji dušika pri temperaturi 60°C.

Ekstrakt C pripremljen je homogeniziranjem uzorka u 50 mL NaOH (0,5 mol L⁻¹) zasićene s NaCl na laboratorijskom homogenizatoru tijekom 2 min na maksimalnoj brzini. Homogenat je filtriran kroz Whatman 4 filter papir te je 2 mL filtrata prebačeno u staklenu epruvetu sa čepom. U epruvetu je dodano 2 mL 1-butanola, nakon čega je epruveta začepljena i ekstrakt je miješan na laboratorijskoj tresilici 10 min pri 70 rpm. Po završetku ekstrakcije 1-butanolom, uzorak je ostavljen 2 min da se odvoje slojevi. 100 µL gornjeg butanolnog sloja pipetirano je u mikrokivetu volumena 1,5 mL te je upareno do suhog u struji dušika pri temperaturi 60°C.



Slika 9. Shematski prikaz usporedbe postupaka pripreme ekstrakata

3.3.3.2. Snimanje i analiza SERS spektara ekstrakata

Pripremljeni ekstrakti čuvani su u zatvorenim mikrokivetama na temperaturi 4°C do trenutka SERS analize. Neposredno prije analize u mikrokivetu je pipetirano 80 µL AGC koloida, 10 µL otopine NaBH₄ (0,23 mol L⁻¹) i 10 µL vode te je miješano 30 s na laboratorijskoj miješalici nakon čega je uzorak prebačen u staklenu kapilaru. SERS spektri uzoraka s koncentracijom histamina 0 – 400 mg kg⁻¹ snimani su u području 1050 – 1650 cm⁻¹ s vremenom ekspozicije 30 s u razmaku od 1 min tijekom prvih 6 min od završetka miješanja svih komponenti.

Snimljeno je 10 spektara po uzorku te je za daljnju analizu i izradu kalibracijskih pravaca korišten prosječni spektar od 10 izvršenih mjerenja.

3.3.4. Obrada SERS spektara

Snimljeni SERS spektri zahtijevaju daljnju obradu, jer uz signale analita sadrže brojne interferencije koje potječu od drugih komponenti prisutnih u uzorku, fluorescencije, šuma i/ili pozadinskog signala detektora. Također brojni parametri kao što su primjerice oscilacije lasera mogu utjecati na apsolutnu vrijednost intenziteta SERS spektra.

S ciljem eliminiranja navedenih utjecaja provodi se optimizacija parametara kako bi se omogućila korekcija pozadinskog signala, šuma te normalizacija spektra.

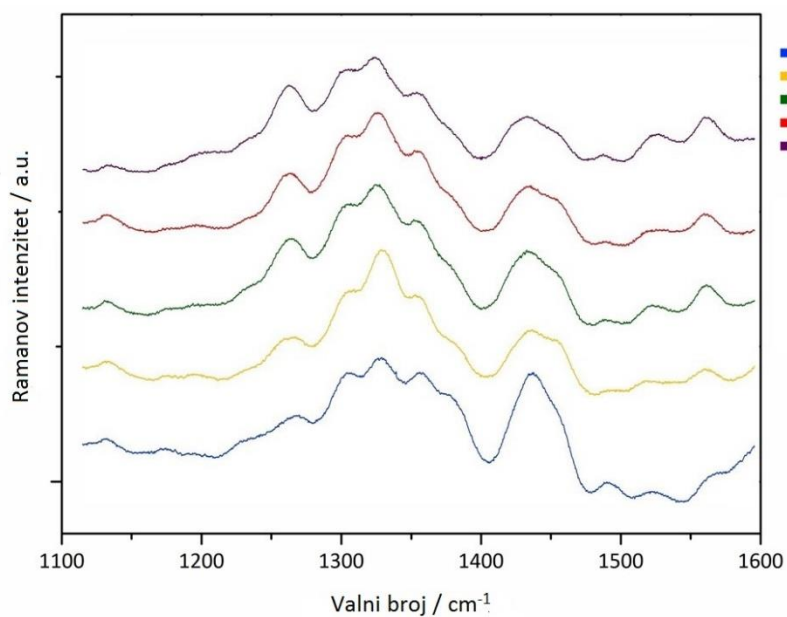
Najbolji način obrade SERS spektra postiže se u programu Labspec 6 (Horiba Scientific). Za korekciju pozadinskog signala koristi se funkcija programa tzv., „*baseline correction*“ na način da je automatski odabrano 40 reprezentativnih točaka u SERS spektru kojima je prilagođen polinom 9. stupnja (eng. *curve fitting*). Pritom se procijenjeni pozadinski signal oduzima od snimljenog spektra. S ciljem povećanja omjera signala i šuma SERS spektri su izgladjeni (eng. *spectral smoothing*) i to primjenom Savitzky Golay algoritma sa širinom prozora $W = 20$ i redom interpolacijskog polinoma $M = 2$. Slijedi normalizacija spektra pri čemu se kao interni standard koristi intenzitet vrpce na 1437 cm⁻¹ prethodno asigniran citratnim ionima prisutnim u AGC koloidu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

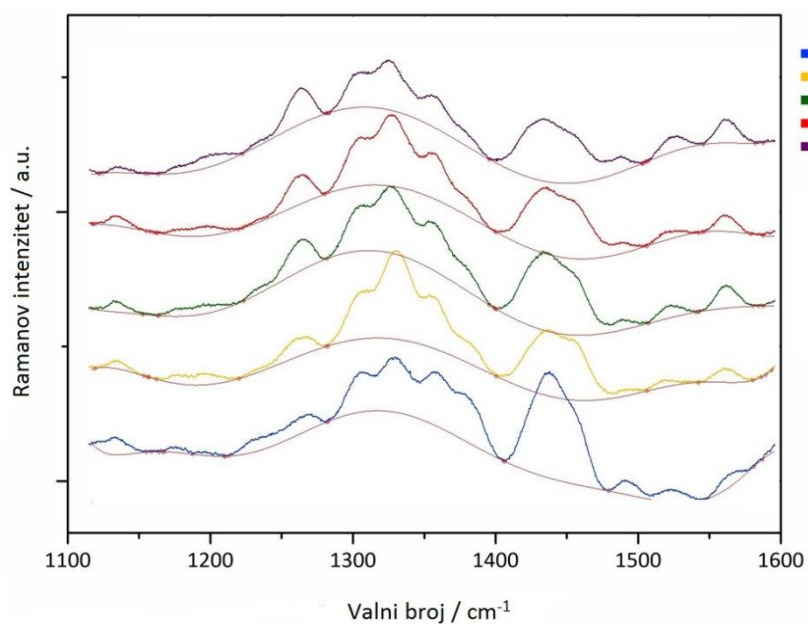
4.1. SERS ANALIZA

Nakon snimanja SERS spektara, isprobano je nekoliko načina predobrade spektara, međutim najboljim načinom pokazala se obrada SERS spektra prema ranije opisanim parametrima. Na slici 10. prikazana je obrada spektara.

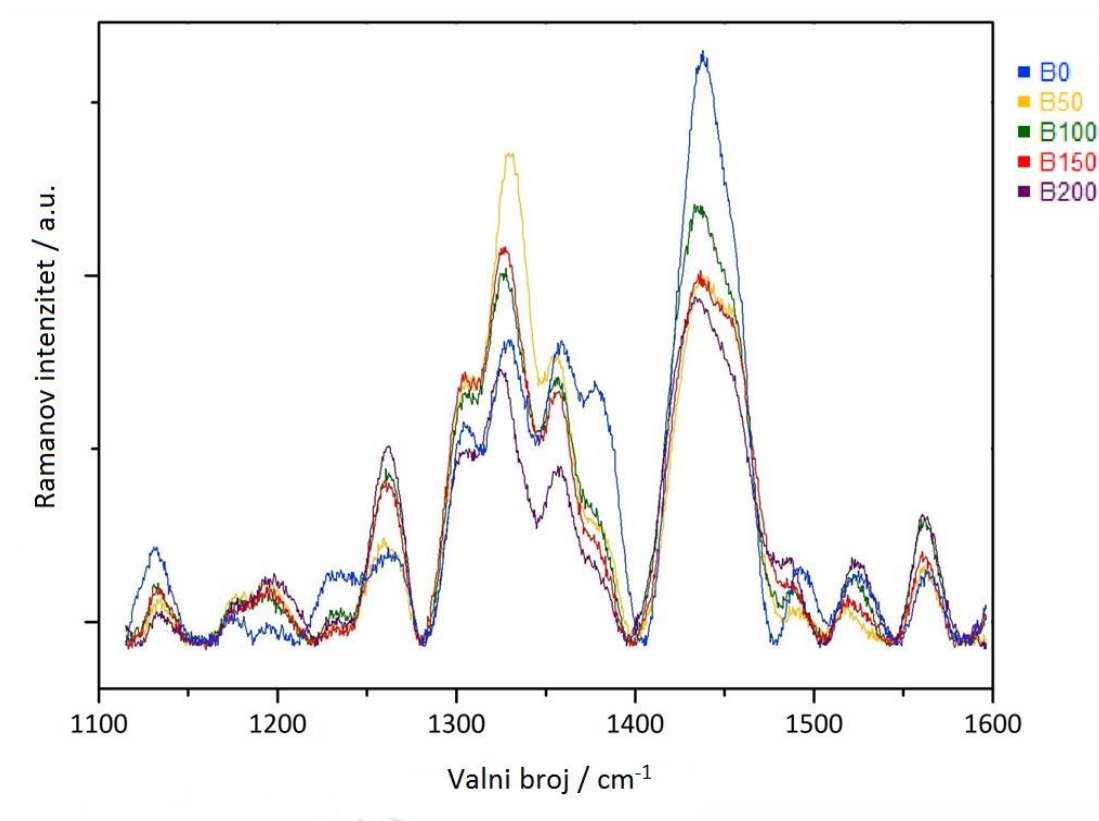
a)



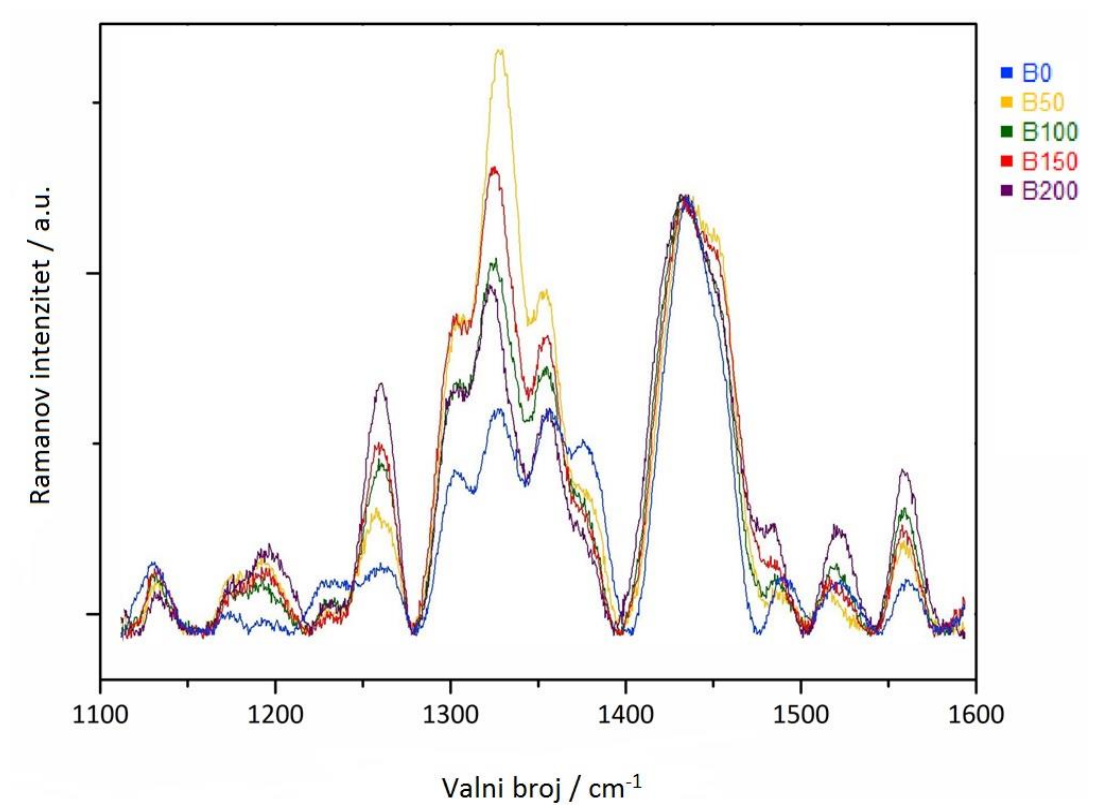
b)



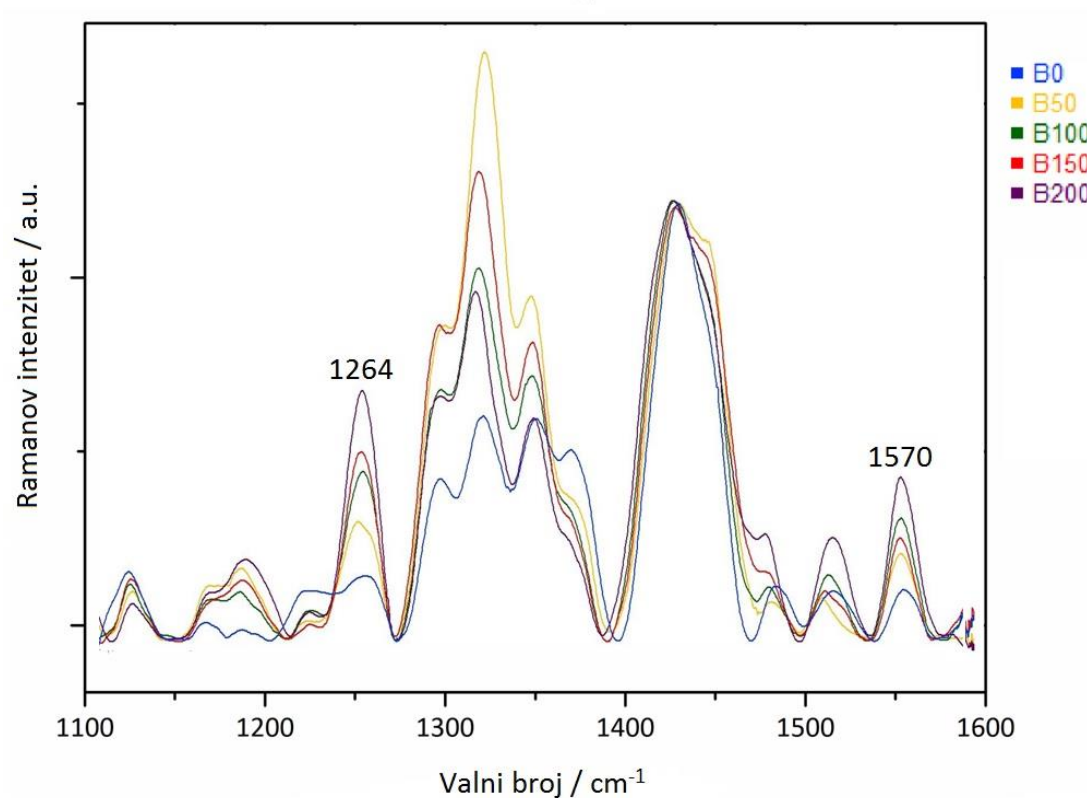
c)



d)



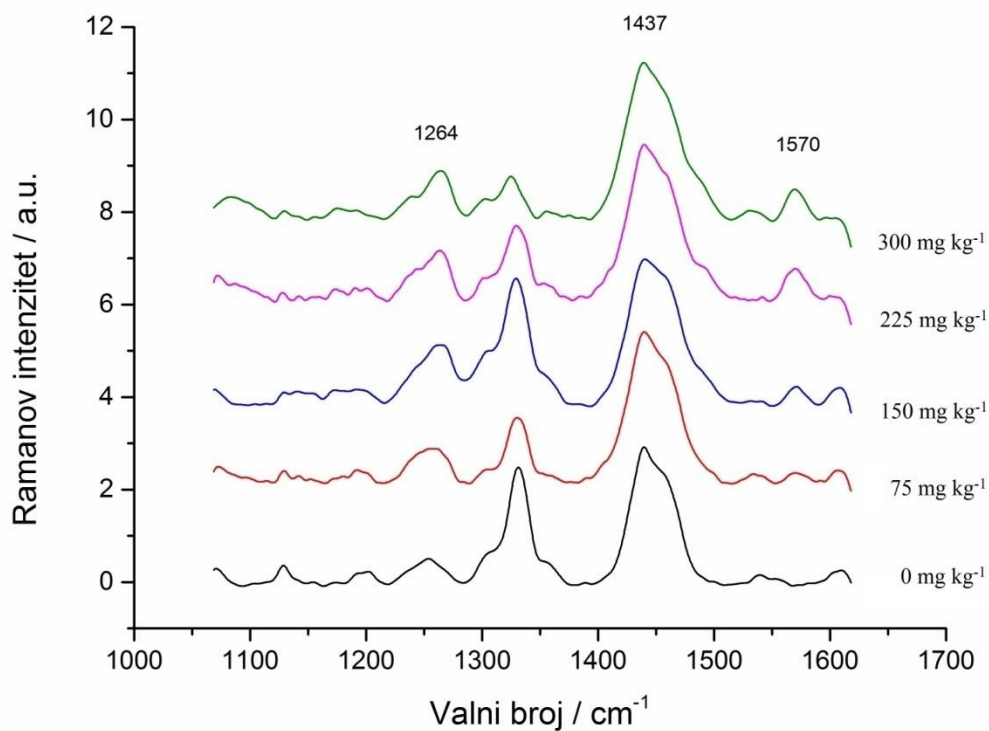
e)



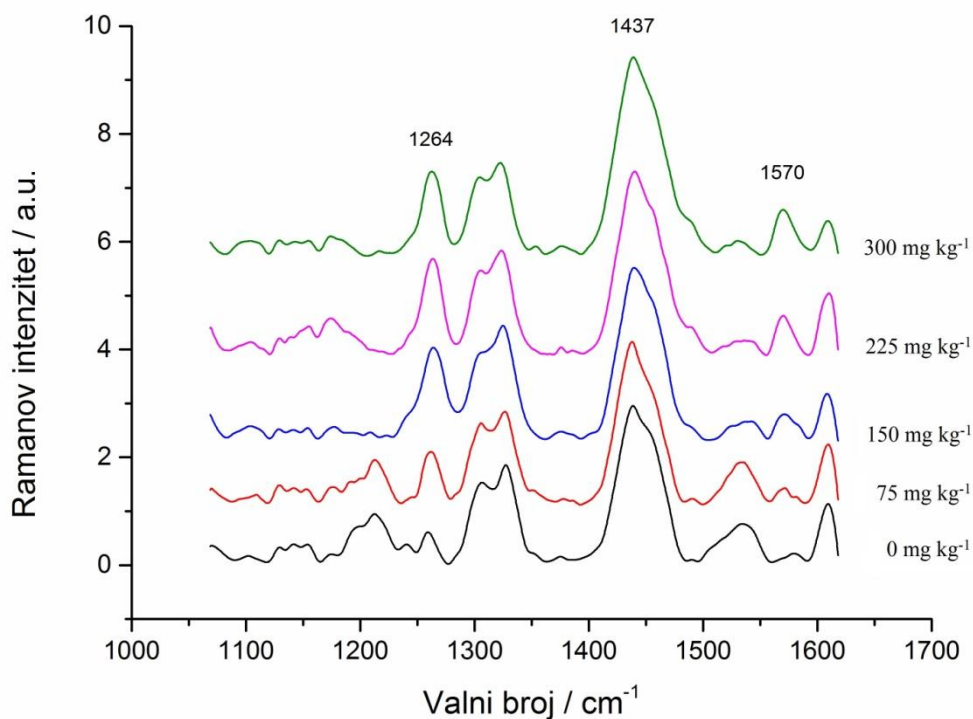
Slika 10. Obrada spektara: a) neobrađeni SERS spektar; b) korekcija pozadinskog signala - aproksimacija bazne linije; c) korekcija pozadinskog signala - oduzimanje aproksimiranog pozadinskog signala; d) normalizacija spektra; e) korekcija šuma

Na temelju rezultata dobivenih u preliminarnom eksperimentu koji ovdje neće biti prikazani, određeno je da se glavni eksperiment provede sa sva tri ekstrakta A, B i C.

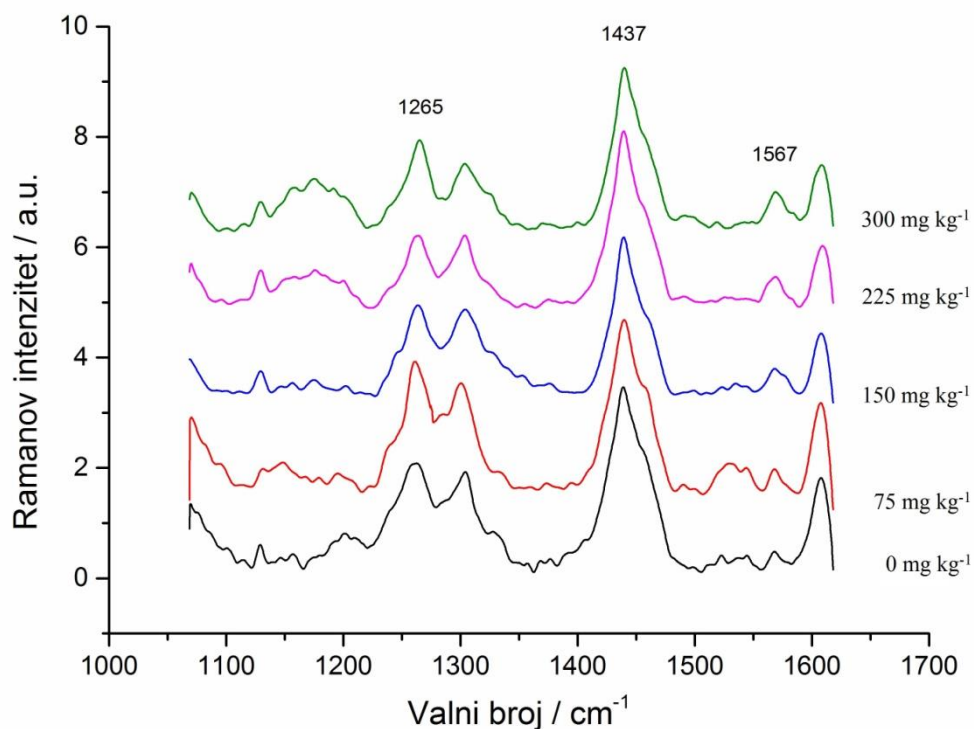
SERS spektri ekstrakata A, B i C u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg⁻¹ prikazani su na slikama 11-13. Na spektrima su vidljive karakteristične histaminske vrpce na 1264 i 1570 cm⁻¹, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm⁻¹.



Slika 11. SERS spektar ekstrakta A u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg⁻¹, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm⁻¹



Slika 12. SERS spektar ekstrakta B u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg⁻¹, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm⁻¹

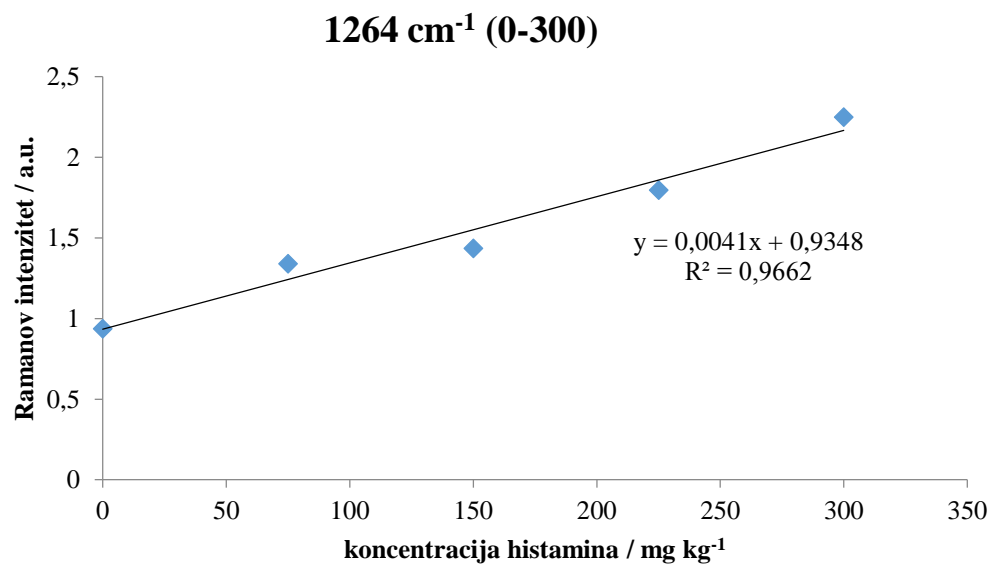


Slika 13. SERS spektar ekstrakta C u rasponu koncentracije histamina od 0 – 300 mg kg⁻¹, normalizirani prema intenzitetu vrpce citrata na 1437 cm⁻¹

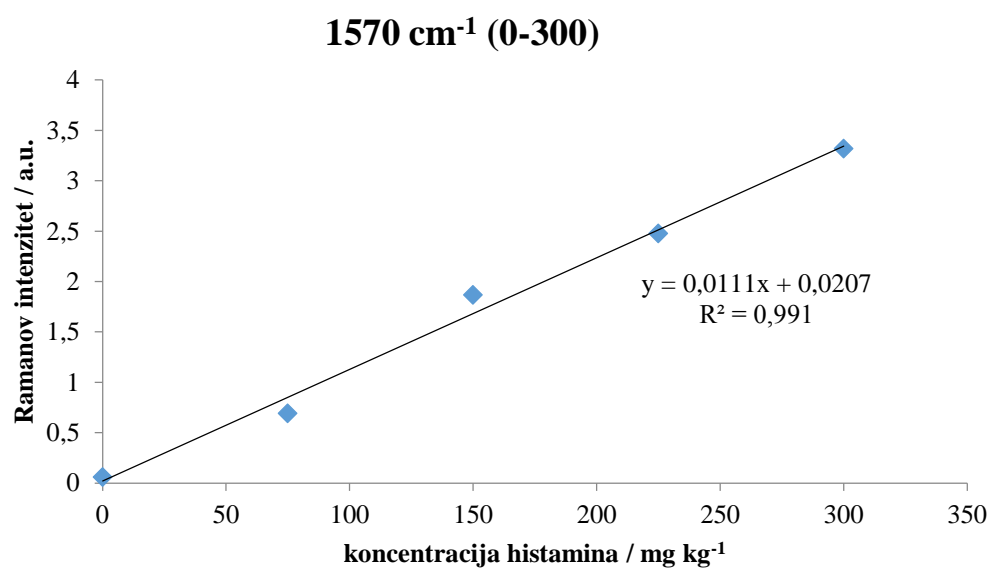
Nakon obrade prikazanih spektara, izradili su se baždarni pravci u rasponu koncentracije histamina 0 – 300 mg kg⁻¹. Dodane koncentracije histamina u baždarnim uzorcima iznosile su 0, 75, 150, 225 i 300 mg kg⁻¹. Za izradu kalibracijskih modela korištene su srednje vrijednosti (10 mjerenja za svaku koncentraciju) intenziteta vrpce histamina na 1264 i 1570 cm⁻¹ te je baždarni pravac konstruiran metodom linearne regresije. Valjanost kalibracijskih modela procijenjena je na osnovi koeficijenta korelacije (R^2). Na slikama 14a, 14b, 15a, 15b, 16a, 16b prikazani su dobiveni baždarni pravci za ekstrakte A, B i C.

Kalibracijski modeli ekstrakta A

a)



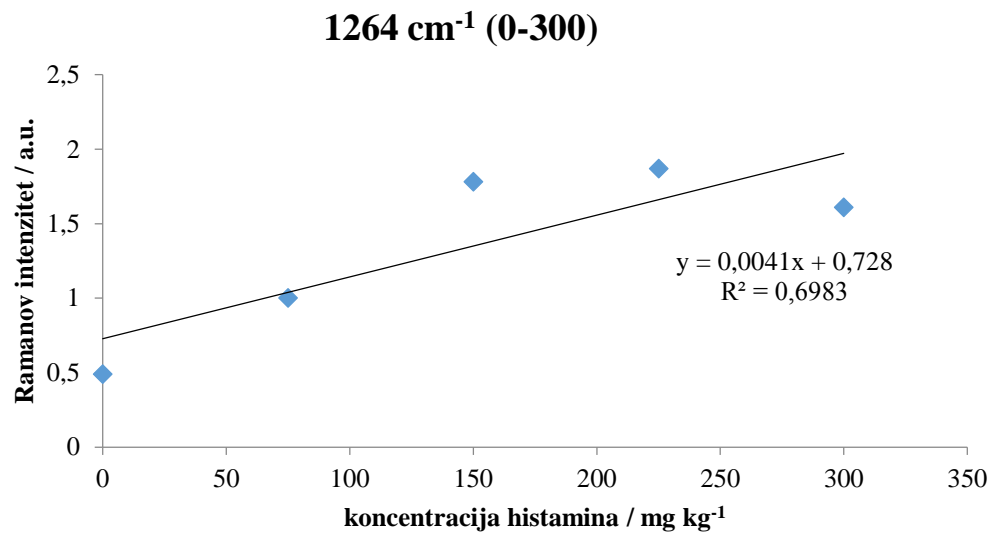
b)



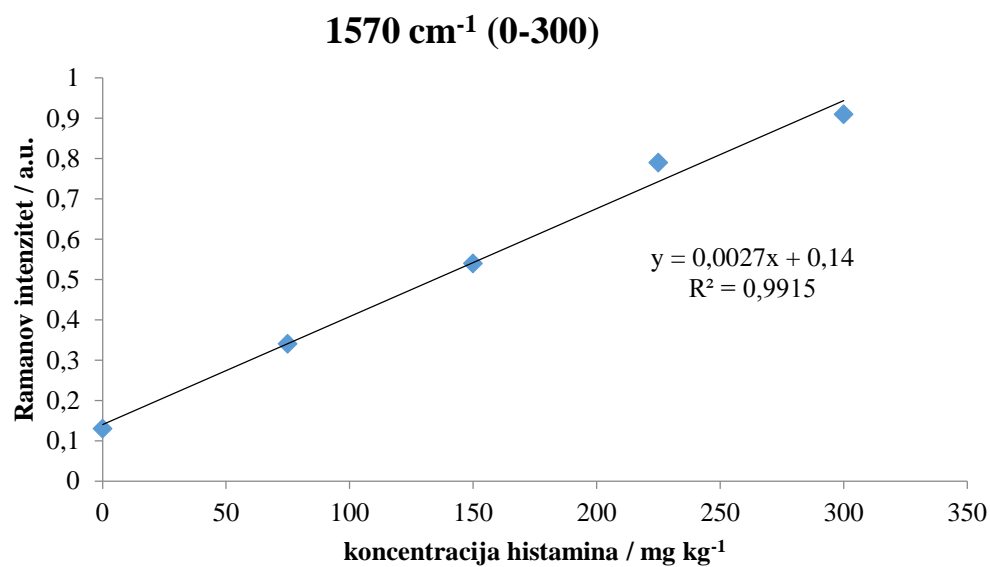
Slika 14. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina a) na 1264 cm⁻¹; b) na 1570 cm⁻¹

Kalibracijski modeli ekstrakta B

a)



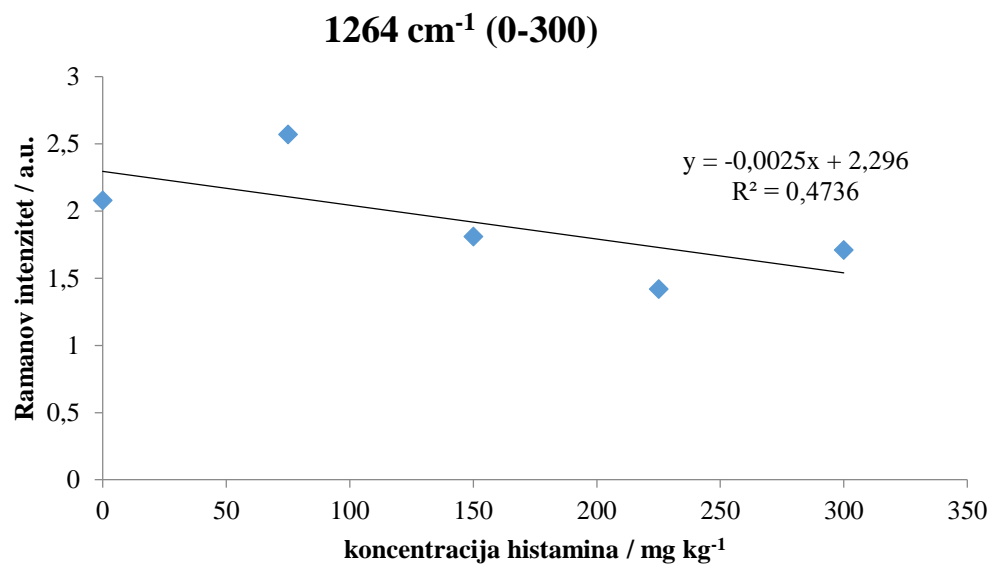
b)



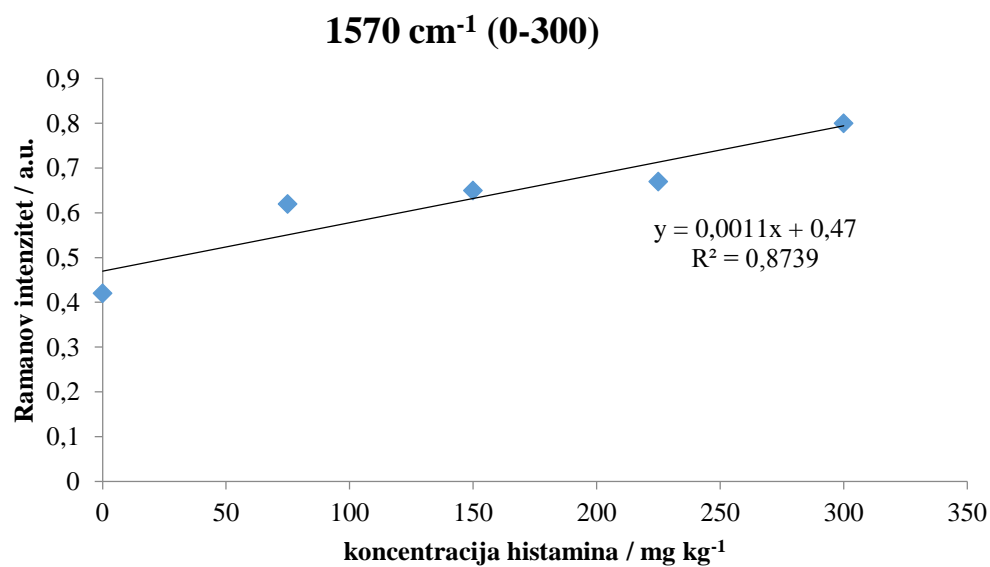
Slika 15. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina a) na 1264 cm⁻¹; b) na 1570 cm⁻¹

Kalibracijski modeli ekstrakta C

a)



b)



Slika 16. Ovisnost Ramanovog intenziteta o koncentraciji histamina a) na 1264 cm⁻¹; b) na 1570 cm⁻¹

Tablica 2. Usporedba rezultata određenih parametara postignutih za različite ekstrakte

Ekstrakt	Vrpca histamina (cm^{-1})	Koeficijent korelacije (R^2)	Rezultati uzorka za provjeru (mg kg^{-1})	Točnost (%)
A	1264	0,966	37,2	93,94
	1570	0,991	38,7	97,73
B	1264	0,698	43,1	108,84
	1570	0,991	38,3	96,72
C	1264	0,473	32,5	82,07
	1570	0,873	33,8	85,35

Nakon snimanja i obrade SERS spektra ekstrakta A, jasno su vidljive karakteristične vrpce histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} (Slika 11) stoga se može zaključiti da je ekstrakcija histamina 0,4 M perkloratnom kiselinom kao i primjena AGC koloida asigiranog citratnim ionima uspješna. Dobiveni rezultati u potpunosti odgovaraju rezultatima istraživanja kojeg su proveli Janči i sur. (2017) u kojem se provela optimizacija parametara Raman spektroskopije, koristeći AGC koloid, za detekciju histamina u tkivu skuše. U njihovom radu najveći intenzitet vrpce histamina zabilježen je na 1268 i 1570 cm^{-1} što pripisuju vibracijama istezanja imidazolnog prstena histamina.

Također, dobiveni rezultati su u skladu s podacima o SERS spektru histamina na srebrnoj elektrodi koje su u ranijim istraživanjima objavili Davis i sur. (1992). Na temelju ovih činjenica, u ovom radu postupak pripreme ekstrakta A koji uključuje ekstrakciju histamina 0,4 M perkloratnom kiselinom uzet je kao standardni postupak za analizu histamina u tkivu palamide. U tom postupku ekstraktu A dodana je odgovarajuća količina NaOH i NaCl-a prije ekstrakcije histamina 1-butanolom nakon čega je odgovarajući volumen butanolnog sloja pipetiran u čistu mikrokivetu te je uzorak uparen do suhog.

Kako bi se dodatno skratilo vrijeme i pojednostavnila priprema uzorka za SERS analizu ispitana su još dva postupka pripreme koja su uključivala homogenizaciju uzorka u otopini NaOH koncentracije 0,1 mol L^{-1} zasićene s NaCl (ekstrakt B) i otopini NaOH koncentracije 0,5 mol L^{-1} zasićene s NaCl (ekstrakt C) nakon čega je provedena ekstrakcija 1-butanolom. Daljni postupak pripreme uzoraka za SERS analizu uključivao je uparavanje butanolnog sloja uzoraka do suhog u

struji dušika pri temperaturi 60°C kao što je opisano u istraživanju kojeg su proveli Janči i sur. (2017).

Valja napomenuti da prilikom provođenja eksperimentalnog dijela ovog rada postupak skraćivanja vremena pripreme uzoraka za SERS analizu koji je uključivao ekstrakciju histamina 0,1 M i 0,5 M NaOH, nije bio nimalo jednostavan. Problem pri izvođenju eksperimenta stvarala je pjena nastala kao posljedica emulzije u uzorcima B i C čime je znatno otežan proces homogenizacije uzoraka. Navedeni problem je riješen na način da su uzorci podvrgnuti centrifugiranju čime se eliminirala nastala pjena.

Snimanjem i obradom SERS spektra ekstrakta B (Slika 12) može se uočiti da su vrpce karakteristične za histamin na 1264 i 1570 cm^{-1} također jasno vidljive, iz čega proizlazi da je ekstrakcija histamina 0,1 M NaOH uspješna. Za razliku od ekstrakta A kod kojeg se za ekstrakciju histamina koristila 0,4 M perkloratna kiselina, ekstrakcija histamina 0,1 M NaOH korištena u ekstraktu B pokazala je također zadovoljavajuće rezultate na temelju čega se može zaključiti da kao takva može imati utjecaj na skraćenje vremena pripreme uzorka za SERS analizu.

Na slici 13. prikazan je SERS spektar ekstrakta C iz kojeg se može jasno uočiti karakteristična vrpca za histamin na 1570 cm^{-1} . Prisutna je i karakteristična vrpca za histamin na 1264 cm^{-1} uz mali pomak koji je vjerojatno posljedica interferencija drugih tvari prisutnih u uzorku. Nepoznate tvari detektirane u uzorku C imaju karakterističnu vrpcu koja je blizu karakteristične vrpce za histamin čime dolazi do njihovog preklapanja pa se karakteristična vrpca za histamin na 1264 cm^{-1} slabije uočava. Upotreba 0,5 M NaOH za ekstrakciju histamina u ekstraktu C nije se pokazala uspješnom u odnosu na ekstrakte A i B u čijem slučaju su se za ekstrakciju histamina koristile 0,4 M perkloratna kiselina (Ekstrakt A) odnosno 0,1 M NaOH (Ekstrakt B). Na temelju dobivenog SERS spektra ekstrakta C može se reći da pri tim uvjetima veća molarna koncentracija NaOH (0,5 M) uz histamin ekstrahira i neke druge tvari prisutne u uzorku.

U SERS spektrima ekstrakata A, B, C prikazanim na slikama vidljiva je vrpca citrata na 1437 cm^{-1} jakog intenziteta koja je korištena kao interni standard. S promjenom koncentracije histamina njen intenzitet se ne mijenja što ukazuje na to da je navedena vrpca karakteristična za AGC koloid čija je koncentracija konstantna u svim provedenim mjerenjima. Budući da su čestice AGC koloida stabilizirane citratnim ionima vrlo je vjerojatno da navedena vrpca potječe od vibracija citratnih iona koji okružuju nanočestice srebra.

Kako bi se konstruirao kalibracijski model koji najbolje opisuje spektralne karakteristike pojedinog uzorka kao funkciju koncentracije histamina konstruirani su kalibracijski modeli temeljeni na intenzitetima vrpce na 1264 i 1570 cm^{-1} metodom linearne regresije.

Učinkovitost pojedinog kalibracijskog modela temeljena je na koeficijentu korelacije (R^2), odnosno bolji model je onaj koji ima veći koeficijent korelacije. Dobivene vrijednosti koeficijenta korelacije prikazane su u Tablici 2.

Koeficijent korelacije najveći je kod kalibracijskih modela temeljenih na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} dobivenih postupkom ekstrakcije histamina 0,4 M perkloratnom kiselinom (Ekstrakt A) i ekstrakcije histamina 0,1 M NaOH (Ekstrakt B), a iznosi $R^2 = 0,991$. Najniži koeficijent korelacije na istom intenzitetu vrpce (1570 cm^{-1}) ima model ekstrakta C (ekstrakcija histamina 0,5 M NaOH) koji iznosi $R^2 = 0,873$.

Koeficijenti korelacije kod svih modela temeljenih na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} niži su u odnosu na iste koeficijente modela temeljenih na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} . Najbolji model temeljen na intenzitetu ove vrpce ima model ekstrakta A ($R^2 = 0,966$). Znatno lošiji koeficijent korelacije ima model ekstrakta B ($R^2 = 0,698$), a najlošijim modelom pokazao se model ekstrakta C ($R^2 = 0,473$).

Dobiveni rezultati nisu u skladu s istraživanjem koje su proveli Janči i sur. (2016) gdje je koeficijent korelacije (R^2) veći kod modela koji se temelji na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} . Razlog tome su vjerojatno razlike u pripremi uzoraka.

Iz baždarnih dijagrama (Slika 14a, 14b, 15a, 15b, 16b) vidljivo je da intenzitet vrpce histamina raste s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što potvrđuje rezultate Jančija (2016). Iznimka je model ekstrakta C (Slika 16a) temeljen na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} u kojem intenzitet vrpce histamina opada s povećanjem koncentracije histamina u uzorku što samo potvrđuje prethodno navedene činjenice da se radi o najlošijem modelu.

Točnost metode definira se kao stupanj podudaranja između stvarne, tj. prihvaćene referencijske vrijednosti i srednje vrijednosti dobivene primijenjenim postupkom određeni broj puta (Lazarić, 2012).

Za provjeru točnosti različitih metoda, tj. postupaka pripreme uzoraka korišten je kontrolni uzorak prethodno ostavljen na sobnoj temperaturi kako bi došlo do prirodnog formiranja histamina. Istinitost metode moguće je procijeniti na nekoliko načina, a u ovom radu kontrolni uzorak analiziran je HPLC metodom s ciljem utvrđivanja točnog sadržaja histamina koji je iznosio 39,6 mg

kg⁻¹ (100%-tna točnost).

Na temelju rezultata prikazanih u Tablici 2. može se zaključiti da je ekstrakt B (38,3 mg kg⁻¹) najbliže stvarnoj vrijednosti (39,6 mg kg⁻¹), izuzev ekstrakta A (97,73 mg kg⁻¹) koji je očekivano najbliži navedenoj vrijednosti s obzirom da je uzet kao standard. Drugim riječima, najveća točnost postignuta je primjenom modela ekstrakta B dobivenog linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na 1570 cm⁻¹ (96,72%-tna točnost).

Dobiveni rezultati nisu u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju o mogućnosti primjene Raman spektroskopije pri kontroli kvalitete ribe u kojem je najveća točnost postignuta primjenom modela dobivenog linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na 1264 cm⁻¹ (Janči, 2016).

Očekivano najmanju točnost odnosno najveće odstupanje od stvarne vrijednosti pokazao je model ekstrakta C (32,5 mg kg⁻¹) dobiven linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na 1264 cm⁻¹ (82,07 %-tna točnost).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Nakon snimanja i obrade svih SERS spektara, u SERS spektru ekstrakta B jasno su vidljive karakteristične vrpce histamina na 1264 i 1570 cm^{-1} iz čega proizlazi da se ekstrakcija histamina $0,1\text{ M NaOH}$ kao i primjena AGC koloida asigniranog citratnim ionima pokazala najuspješnijom.
2. Koeficijent korelacije najveći je kod kalibracijskog modela ekstrakta B temeljenog na intenzitetu vrpce na 1570 cm^{-1} , a iznosi $R^2 = 0,991$. Kod istog modela temeljenog na intenzitetu vrpce na 1264 cm^{-1} ovaj koeficijent iznosi $R^2 = 0,698$ i znatno je niži u odnosu na koeficijent korelacije standardnog modela (Ekstrakt A) koji iznosi $R^2 = 0,966$. Iz navedenog možemo zaključiti da se model ekstrakta B pokazao lošijim u odnosu na standardni model ekstrakta A vjerojatno zbog razlike u pripremi uzoraka.
3. Najveća točnost postignuta je primjenom modela ekstrakta B dobivenog linearnom regresijom na temelju intenziteta SERS vrpce histamina na 1570 cm^{-1} (96,72%-tna točnost).
4. Najlošijim modelom prema svim parametrima pokazao se model ekstrakta C u kojem je ekstrakcija histamina provedena $0,5\text{ M NaOH}$ vjerojatno iz razloga što veća molarna koncentracija NaOH ($0,5\text{ M}$) uz histamin ekstrahira i neke druge tvari prisutne u uzorku koje onemogućuju točnu detekciju i kvantifikaciju histamina.
5. Iako se postupak pripreme ekstrakta B za detekciju histamina SERS analizom pokazao uspješnim te vrlo blizu standardnom postupku, njegova daljnja primjena nije preporučiva zbog problema koji se javljaju u procesu homogenizacije uzorka.

6. LITERATURA

Albrecht, M. G., Creighton, J. A. (1977) Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 5215-5217.

Aroca, R. F., Alvarez-Puebla, R. A., Pieczonka, N., Sanchez-Cortez, S., Garcia-Ramos, J. V. (2005) Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. *Adv. Colloid Interfac.* **116**, 45-61.

Bocklitz, T., Walter, A., Hartmann, K., Rosch, P., Popp, J. (2011) How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models? *Anal. Chim. Acta* **704**, 47-56.

Bogdanović, T., S. Lelas, E. Listeš, V. Šimat (2009) Histamini i biogeni amini kao indikatori svježine ribe i ribljih proizvoda. *Meso* **11** (5), 291-294.

Cao, L., Tong, L., Diao, P., Zhu, T., Liu, Z. (2004) Kinetically controlled Pt deposition onto self-assembled Au colloids: Preparation of Au (core)-Pt (shell) nanoparticle assemblies. *Chem. Mater.* **16**, 3239-3245.

Davis, K. L., McGlashen, M. L., Morris, M. D. (1992) Surface-enhanced Raman scattering of histamine at silver electrodes. *Langmuir* **8**, 1654-1658.

Dick, L. A., Haes, A. J., Van Duyne, R. P. (2000) Distance and Orientation Dependence of Heterogeneous Electron Transfer: A Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Study of Cytochrome c Bound to Carboxylic Acid Terminated Alkanethiols Adsorbed on Silver Electrodes. *J. Phys. Chem B* **104**, 11752-11762.

Emborg, J., Dalgaard, P. (2006) Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *J. Food Prot.* **69**, 897-906.

Etchegoin, P. G., Le Ru, E. C. (2010) Basic Electromagnetic Theory of SERS. U: Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Analytical, Biophysical and Life Science Applications (S. Schlücker, ured.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, str. 1-37.

FAO (1994) Osiguranje kakvoće namirnica iz mora, Ribarstveni tehnički materijal FAO-a, br. 334., Rim: Ribarstvo, Gospodarsko interesno udruženje prerađivača ribe, Zagreb, str. 28-29.

FAO/WHO (2013) *Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting report.*
<http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/news_events/Histamine_Final_Report.pdf>.
Pristupljeno 08.04.2017.

FDA (2011) Scombrototoxin (Histamine) Formation. *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance* 4. izd. Washington, DC, USA: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutr., Office of Food Safety.

Feilchenfeld, H., Luckier, M., Efron, L., Willner, B. (1992) The adsorption of acetylene on rhodium-modified colloidal silver, a surface-enhanced Raman study. *Surf. Sci.* **268**, 127-134.

Ferraro, J. R. (2003) *Introductory raman spectroscopy*, Academic press.

Flamini, R. (2008) *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

Fleischmann, M., Hendra, P. J., McQuillan, A. J. (1974) Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163-166.

Frank, H. A., Yoshinaga, D. H., Nip, W.-K. (1981) Histamine formation and honeycombing during decomposition of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, at elevated temperatures. *Mar. Fish. Rev.* **43**, 9-14.

García-Rodríguez, F. J., González-Hernández, J., Pérez-Robles, F., Vorobiev, Y. V., Manzano-Ramírez, A., Jiménez-Sandoval, S., Chao, B. S. (1998) Sol-Gel SiO₂ Films Containing Colloidal Copper Particles for Surface-enhanced Raman Scattering of Graphite. *J. Raman Spectrosc.* **29**, 763-771.

Hungerford, J.M. (2010) Scombroid poisoning: a review. *Toxicon.* **56**, 231-243.

Janči, T. (2016) *Mogućnost primjene Raman spektroskopije pri kontroli kvalitete ribe*. Doktorski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Janči, T., Valinger, D., Gajdoš Kljusurić, J., Mikac, L., Vidaček, S., Ivanda, M. (2017) Determination of histamine in fish by Surface Enhanced Raman Spectroscopy using silver colloid SERS substrates. *Food Chem.* **224**, 48–54.

Jeanmaire, D. L., Van Duyne, R. P. (1977) Surface raman spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* **84**, 1-20.

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M., Tsukamoto, T. (2004) Photobacterium phosphoreum caused a histamine fish poisoning incident. *Int. J. Food Microbiol.* **92**, 79-87.

Kho, K. W., Shen, Z. X., Zeng, H. C., Soo, K. C., Olivo, M. (2005) Deposition Method for Preparing SERS-Active Gold Nanoparticle Substrates. *Anal. Chem.* **77**, 7462-7471.

Kleinman, S. L., Frontiera, R. R., Henry, A.-I., Dieringer, J. A., Van Duyne, R. P. (2013) Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 21-36.

Lazarić, K. (2012) Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri.* **1**, 61-65.

Le Ru, E. C., Etchegoin, P. G. (2009) *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects*, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier B.V. Amsterdam, The Netherlands.

Lee, P. C., Meisel, D. (1982) Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **86**, 3391-3395.

Long, D. A. (2002) *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.

Lu, L., Sun, G., Zhang, H., Wang, H., Xi, S., Hu, J., Tian, Z., Chen, R. (2004) Fabrication of core-shell Au-Pt nanoparticle film and its potential application as catalysis and SERS substrate. *J. Mater. Chem.* **14**, 1005-1009.

- Malle P., Valle M., Bouquelet S. (1996) Assay of biogenic amines involved in fishdecomposition. *J. AOAC Internat.* **79**, 43-49.
- Mathies, R. A. (1995) Biomolecular vibrational spectroscopy. *Method. enzymol.* **246**, 377-389.
- McNay, G., Eustace, D., Smith W.E., Faulds, K., Graham, D (2011) Surface-enhanced raman scattering (SERS) and surface-enhanced resonance raman scattering (SERS): a review of applications. *Appl. Spectrosc.* **65**, 825-837.
- McQuillan, A. J. (2009) The discovery of surface-enhanced Raman scattering. *Notes Rec.* **63**, 105-109.
- Mendes, R. (2009) Biogenic amines. U: *Fishery products Quality, Safety and Authenticity*. (Rehbein, H., Oehlenschläger, J., ured.), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, str. 42-67.
- Moskovits, M. (1978) Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *J. Chem. Phys.* **69**, 4159-4161.
- Mosier-Boss, P. A., Lieberman, S. H., Newbery, R. (1995) Fluorescence Rejection in Raman Spectroscopy by Shifted-Spectra, Edge Detection, and FFT Filtering Techniques. *Appl. Spectrosc.* **49**, 630-638.
- Park, S., Yang, P., Corredor, P., Weaver, M. J. (2002) Transition metal-coated nanoparticle films: Vibrational characterization with surface-enhanced Raman scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2428-2429.
- Peticolas, W. L. (1995) Raman spectroscopy of DNA and proteins. *Method. Enzymol.* **246**, 389-416.
- Qu, L. L., Li, D. W., Xue, J. Q., Zhai, W. L., Fossey, J. S., Long, Y. T. (2012) Batch fabrication of disposable screen printed SERS arrays. *Lab. Chip* **12**, 876-81.
- Sánchez-Cortés, S., García-Ramos, J. V. (2000) Surface-enhanced Raman of 1,5-dimethylcytosine adsorbed on a silver electrode and different metal colloids: Effect of charge transfer mechanism. *Langmuir* **16**, 764-770.

- Sauer, G., Nickel, U., Schneider, S. (2000) Preparation of SERS-active silver film electrodes via electrocrystallization of silver. *J. Raman Spectrosc.* **31**, 359-363.
- Schulze, G., Jirasek, A., Yu, M. M., Lim, A., Turner, R. F., Blades, M. W. (2005) Investigation of selected baseline removal techniques as candidates for automated implementation. *Appl. Spectrosc.* **59**, 545-74.
- Singh, R. (2002) C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect. *Phys. Persp.* **4**, 399-420.
- Srnová, I., Vlčková, B., Baumruk, V. (1997) Enhanced Raman spectra of 2,2'-bipyridine adsorbed on aggregated palladium colloidal particles. *J. Mol. Struc.* **410-411**, 201-203.
- Takenaka, T., Eda, K. (1985) Surface enhanced raman scattering by 4-bromopyridine adsorbed on colloidal AuPt alloy particles. *J. Colloid Interface Sci.* **105**, 342-347.
- Tao, A., Sinsermsuksakul, P., Yang, P. (2007) Tunable plasmonic lattices of silver nanocrystals. *Nat Nano* **2**, 435-440.
- Taylor, S. L., Lyons D.E. (1984): Toxicology of Scombroid Poisoning. U: Seafood toxins. Ragelis, E. P. (ured.), Washington, D.C., *J. Am. Chem. Soc.* str. 417-430.
- Taylor, S.L. (1986) Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects. *Crit. Rev. Toxicol.* **17**, 91-128.
- Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu. *Službeni list Europske unije*, L 338/1, Bruxelles.
- Vandenabeele, P. (2013) *Practical Raman spectroscopy - an introduction*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Vidaček S. (2013) Tehnologija ribe, Konzerviranje proizvoda ribarstva hlađenjem. str. 50-77.
- Vranešić, Bender, D., Verbanac, D., Krznarić, Ž. (2010) Intolerancija na histamin. *Dijetetika.* **86**, 174-178.

Vusilović, R., Cvrtila Fleck, Ž., Zdolec, N., Filipović, I., Kozačinski, L., Njari, B., Hadžiosmanović, M. (2008) Higijensko značenje histamina u ribi, *Meso* **10** (1), 40- 45.

Yu, W. W., White, I. M. (2010) Inkjet Printed Surface Enhanced Raman Spectroscopy Array on Cellulose Paper. *Anal. Chem.* **82**, 9626-9630.

Yu, W. W., White, I. M. (2012) A simple filter-based approach to surface enhanced Raman spectroscopy for trace chemical detection. *The Analyst*, **137**, 1168-1173.

Yuen, C., Zheng, W., Huang, Z. (2008) Surface-enhanced Raman scattering: principles, nanostructures, fabrications, and biomedical applications. *J. Innov. Opt. Health Sci.* **01**, 267-284.